

Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Roger Stephan

**Untersuchungen zu verschiedenen mikrobiologischen
Parametern in Rohmilch und Rohmilchkäse einer
Biokäsereigenossenschaft über den Zeitraum eines Jahres**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Martina Rusch

Tierärztin
von Appenzell

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Roger Stephan, Referent

Prof. Dr. Felix Ehrensperger, Korreferent

Zürich 2005

MEINEM GROSSDÄDI

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung / Summary	Seite	4
2	Einleitung	Seite	6
3	Literaturübersicht	Seite	8
3.1	Mikrobiologie der Käse	Seite	8
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Seite	9
3.3	STEC	Seite	13
3.4	Listerien	Seite	16
4	Material und Methoden	Seite	21
4.1	Milchbetriebe und Käserei	Seite	21
4.2	Käseherstellung	Seite	21
4.3	Pobenentnahme	Seite	22
4.4	Mikrobiologische Untersuchungen	Seite	22
4.4.1	Aerobe und anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl Milch	Seite	23
4.4.2	Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl Käse	Seite	23
4.4.3	Nachweis der <i>Enterobacteriaceae</i> in der Milch	Seite	23
4.4.4	Nachweis der <i>Enterobacteriaceae</i> im Käse	Seite	24
4.4.5	Nachweis und weitergehende Charakterisierung von <i>Staphylococcus aureus</i> in der Milch, im Käse und im Salzbad	Seite	24
4.4.5.1	Keimzählung	Seite	24
4.4.5.2	Weitergehende Untersuchungen	Seite	25
4.4.6	Nachweis der Milchsäurebildner im Käse	Seite	28
4.4.7	Nachweis und weitergehende Charakterisierung Shigatoxin-bildender <i>E.coli</i> (STEC)	Seite	29
4.4.7.1	PCR	Seite	29

4.4.7.2	Isolierung und Charakterisierung von STEC	Seite 30
4.4.8	Nachweis von <i>Listeria</i> spp.	Seite 30
4.5	Messung ausgewählter Parameter im Käse	Seite 31
4.5.1	a_w -Wert - Bestimmung im Käse	Seite 31
4.5.2	pH-Wert - Bestimmung im Käse	Seite 32
5	Ergebnisse	Seite 33
5.1	Quantitative mikrobiologische Untersuchungen von Rohmilch	Seite 33
5.1.1	Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	Seite 33
5.1.1.1	GKZ-Einzelergebnisse geordnet nach Betrieben	Seite 33
5.1.1.2	Betriebsübergreifende Darstellung und Auswertung der GKZ-Einzelergebnisse	Seite 34
5.1.2	Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl	Seite 36
5.1.2.1	Anaerobe GKZ-Einzelergebnisse geordnet nach Betrieben	Seite 36
5.1.2.2	Betriebsübergreifende Darstellung und Auswertung der anaeroben GKZ-Einzelergebnisse	Seite 37
5.1.3	<i>Enterobacteriaceae</i>	Seite 40
5.1.3.1	<i>Enterobacteriaceae</i> -Ergebnisse geordnet nach Betrieben	Seite 40
5.1.4	<i>S.aureus</i>	Seite 41
5.1.4.1	<i>S.aureus</i> -Ergebnisse geordnet nach Betrieben	Seite 41
5.1.5	Gegenüberstellung der GKZ-Ergebnisse und des Anteils <i>Enterobacteriaceae</i> -positiver Proben	Seite 44
5.1.6	Gegenüberstellung der GKZ-Ergebnisse und des Anteils <i>S.aureus</i> -positiver Proben	Seite 46
5.2	Quantitative mikrobiologische Untersuchungen der Käse	Seite 47
5.2.1	Verlaufskurve der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl	Seite 47
5.2.2	Milchsäurebildner	Seite 47

5.2.3	<i>Enterobacteriaceae</i>	Seite 48
5.2.4	<i>S.aureus</i>	Seite 48
5.3	Qualitative mikrobiologischen Untersuchungen von Rohmilch und Rohmilchkäse	Seite 50
5.3.1	Shigatoxin-bildende <i>E.coli</i> (STEC)	Seite 50
5.3.2	Listerien	Seite 51
5.4	Ausgewählte Parameter im Käse	Seite 51
5.4.1	Ergebnisse der a_w -Wert-Bestimmung im Käse	Seite 51
5.4.2	Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung im Käse	Seite 52
6	Diskussion	Seite 53
6.1	Quantitative Parameter	Seite 53
6.1.1	Rohmilch	Seite 53
6.1.2	Käse	Seite 54
6.1.2.1	Enterotoxinbildung im Käse	Seite 56
6.1.2.2	Genotypen der <i>S.aureus</i> -Isolate aus Milch und Käse	Seite 57
6.2	Qualitative Parameter	Seite 57
6.2.1	STEC in Milch	Seite 57
6.2.2	STEC in Käse	Seite 58
6.2.3	Listerien in Milch	Seite 60
6.2.4	Listerien in Käse	Seite 61
6.3	Schlussfolgerungen	Seite 63
7	Abbildungen	Seite 64
8	Literatur	Seite 99
9	Dank	Seite 112

1 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Erarbeitung von Grundlagen, um für einen Rohmilchhalbhartkäse einer Biokäsereigenossenschaft ein risikobasiertes bakteriologisches Monitoringsystem aufzubauen. Dafür sollten anhand ausgewählter mikrobiologischer Parameter die Bestandesmilchproben der einzelnen Milchlieferanten und die daraus hergestellten Käsechargen über ihre Reifeperiode hinweg verfolgt werden, um darauf basierend die Entwicklung von Indikatorkeimen und spezifisch pathogenen Keimen einschätzen zu können.

Insgesamt wurden 283 Bestandesmilchproben, 37 Produktionssammelmilchproben und 46 verschiedene Käsechargen in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Gesamtkeimzahl-Mittelwerte der Bestandesmilchproben lagen zwischen $2.8 \log_{10}$ KBE/ml und $3.8 \log_{10}$ KBE/ml, die Nachweishäufigkeit der *Enterobacteriaceae* und der *S.aureus* bei 53% bzw. 50%. Die Keimzahlen dieser beiden Parameter erreichten in den Käsechargen jeweils am 7. Reifungstag ihren Höchstwert (Maximum $3.6 \log_{10}$ KBE/g; $4.0 \log_{10}$ KBE/g) und lagen nach dem 63. Reifungstag im überwiegenden Teil der Chargen unter der Nachweisgrenze. STEC konnte in 7 Bestandesmilchproben und in 5 Käsechargen, Listerien in keiner Probe nachgewiesen werden.

Mikrobiologische Produktuntersuchungen für *S.aureus* sollten am 7. Reifungstag, jene für alle anderen Parameter erst nach 60 Tagen Reifung vorgesehen werden. Vor dem Hintergrund der Produktesicherheit ist für diesen Rohmilchhalbhartkäse eine minimale Reifungszeit von >60 Tagen zwingend zu fordern.

Summary

The aim of this study was to acquire a database to establish a microbiological monitoring system for a semi-hard raw milk cheese produced by bio-farms. Bulk tank milk samples of each producer and different cheese batches on various stages of production were analyzed for total viable count (TVC), *Enterobacteriaceae*, *S.aureus*, *Listeria* and STEC.

Overall, 283 bulk tank milk samples, 37 cheese-dairy milk samples and 46 cheese batches were examined.

Mean log TVC in bulk tank milk ranged from 2.8 to 3.8 cfu/ml. The prevalence of *Enterobacteriaceae*- and *S.aureus*-positive samples was 53% and 50%, respectively.

For cheese batches, time trend graphs were determined. The highest counts of *Enterobacteriaceae* and *S.aureus* were detected on day seven of ripening (3.6 log cfu/ml; 4.0 log cfu/ml). Most of the isolated and further characterized *S.aureus* strains harboured sea enterotoxin genes. By day 63 of ripening *Enterobacteriaceae* and *S.aureus* colony counts in most batches were below detection limit. In seven bulk tank milk samples and five cheese batches STEC were present. *Listeria* were not detected in any sample.

In consequence, examinations for *S.aureus* should be performed on day seven, and for *Enterobacteriaceae* after 60 days of ripening. In view of product safety, a minimal ripening period of 60 days must be required for this semi-hard raw milk cheese.

2 Einleitung

In der Schweiz werden die gesetzlichen Anforderungen an die Qualität der Verkehrsmilch und der Milchprodukte in der Verordnung über die Qualitätssicherung bei der Milchproduktion (Milchqualitätsverordnung) und in der Verordnung über die Qualitätssicherung bei der gewerblichen Milchverarbeitung festgelegt. Die Kantone unterhalten zusammen mit den milchwirtschaftlichen Organisationen Inspektions- und Beratungsdienste (MIBD). Der MIBD kontrolliert in regelmässigen Abständen die Verkehrsmilch jedes Produzenten nach den in der Milchqualitätsverordnung gesetzlich festgelegten Grundanforderungen (Keimbelastung, Zellgehalt, Hemmstoffgehalt, Gefrierpunkt). Innerhalb dieses Monitorings der Verkehrsmilch wird jedoch nicht nach pathogenen Mikroorganismen gesucht.

Seit einigen Jahren hat die Beliebtheit von Bioprodukten stark zugenommen. Immer mehr Konsumentinnen und Konsumenten kaufen naturbelassene Produkte, dabei sind vor allem nicht hitzebehandelte Lebensmittel, wie z.B. Rohmilchkäse besonders gefragt. Im Zuge dieses Trends bemühen sich auch milchproduzierende Betriebe selbst um die Verarbeitung ihrer Milch. So entstanden und entstehen immer mehr Käsereigenossenschaften und Hofkäsereien, die ihre eigenen Rohmilchprodukte herstellen und zum Teil direkt vermarkten.

Aus Sicht der Produktesicherheit hat dabei, insbesondere bei der Herstellung von Weich- und Halbhartkäse, die mikrobiologische Qualität der zu verarbeitenden Rohmilch eine ganz besondere Bedeutung. Rohmilch und Rohmilchprodukte können Krankheitserreger und deren Toxine enthalten und unter gewissen Bedingungen ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, nach einer aufgrund von zu hohen *S.aureus* Keimzahlen ausgesprochenen Beanstandung einer grösseren Charge Biogomser durch eine der beiden grossen Detailhandelsketten der Schweiz, Grundlagen für ein risikobasiertes mikrobiologisches Monitoringsystem dieses

Bioproduktes zu erarbeiten. Dabei sollten anhand ausgewählter mikrobiologischer Parameter die Bestandesmilchproben der einzelnen Milchlieferanten und auch die daraus hergestellten Käsechargen über ihre Reifeperiode hinweg verfolgt werden, um basierend auf diesen Daten die Entwicklung von Indikatorkeimen und spezifisch Pathogenen einschätzen zu können. Diese während eines Jahres dauernden Untersuchungen sollten im Besonderen auch die Zeit vor und nach der Alpung der Tiere mit berücksichtigen. Diese Daten sollen in ein, im Rahmen der Selbstkontrolle von der Biokäsereigenossenschaft zu etablierendes Überwachungssystem, einfließen.

Dafür erfolgte während eines Jahres eine wöchentliche Erhebung und Untersuchung von Bestandesmilchproben jedes Milchproduzenten (n=11) dieser Biokäsereigenossenschaft sowie Stufenkontrollen der daraus hergestellten Käsechargen an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 63 und 91.

Als mikrobiologische Parameter wurden in der Rohmilch die aerobe und anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae* und *S.aureus* nachgewiesen. Darüber hinaus umfassten die Untersuchungen das Vorkommen der Krankheitserreger *Listeria* spp. und Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC).

Die Untersuchungen der Rohmilchkäsechargen basierten auf dem Gesamtkeimzahl- und Milchsäurebakteriennachweis, sowie dem quantitativen *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* und dem qualitativen *Listeria* spp. und STEC-Nachweis.

3 Literaturübersicht

3.1 Mikrobiologie der Käse

Käse gilt als gesundes und nährhaftes Lebensmittel und wurde ursprünglich entwickelt, um rohe Milch zu konservieren. Die Produktion von Käsen ist ausserordentlich vielfältig. Insgesamt sind auf der Welt weit über 400 Käsesorten bekannt. Den grössten Umfang nehmen die Labkäse ein.

Käse wird als „sicheres“ Produkt angesehen. Trotzdem haben verschiedene Krankheitsausbrüche gezeigt, dass Käse auch Krankheitserreger enthalten können. Aus Gründen der Qualitätssicherung wird heute für die Herstellung der meisten Käse pasteurisierte Milch verwendet. Die Milch wird dafür kurzzeiterhitzt, das heisst für 15 bis 30 Sekunden auf 72 °C bis 75 °C erhitzt. Die Milch für Rohmilchkäse wird dagegen auf höchstens 40 °C erwärmt. Dadurch bleiben die in der Milch enthaltenen Enzyme weitgehend erhalten, was dem Käse später ein besonderes Aroma verleiht. Nachteilig ist, dass so eventuell in der Milch vorhandene Krankheitskeime nicht inaktiviert werden und in den Käse gelangen können. Bei Rohmilchhartkäse kann davon ausgegangen werden, dass bedingt durch die lange Reifungszeit pathogene Mikroorganismen absterben. Dies aufgrund der Säurebildung (tiefer pH-Wert), der kompetitiven Wirkung der Starterkultur und dem sinkenden a_w -Wert. Doch besteht bei der grossen Variabilität der Käsesorten keine allgemeine Gültigkeit, weder für die Käseherstellung noch für das Verhalten der pathogenen Keime.

Die bei den meisten Käsesorten zugegebene Starterkultur besteht aus Milchsäurebakterien. Die Milchsäurebakterien sind von grundlegender Bedeutung für die Herstellung und Reifung der Käse. Sie leiten die erste erwünschte mikrobielle Stoffwechselleistung, die Milchsäuregärung, ein. Dadurch kommt es zu einer Senkung des pH-Werts in einen Bereich, bei dem das Labenzym seine optimale Koagulationswirkung entfaltet. Die Milchsäuregärung hat auch Einfluss auf erwünschte und unerwünschte Blähung und beeinflusst ebenfalls Geschmackseigenschaften der Käse. Für die Teigkonsistenz der Käse sind die Umsetzung der Laktose zu Milchsäure

und die damit gegebene Beeinflussung des Milcheiweisses von grossem Einfluss. Je nach Menge der vorhandenen Milchsäure ergeben sich Teigeigenschaften von weich, schmierig bis hart und bröcklig.

Die Qualität von Weichkäse (z.B. Brie, Camembert) unterscheidet sich stark von der von Hartkäse (z.B. Parmesan, Gruyère, Emmentaler). Es unterscheidet sich nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Wasseraktivität (a_w -Wert) des Endproduktes. Gereifter Brie z.B. hat einen neutralen pH-Wert und eine hohe Wasseraktivität, was das Wachstum vieler pathogener Mikroorganismen erlaubt. Parmesan dagegen weist einen viel tieferen pH-Wert und Wasseraktivität auf, was mikrobielles Wachstum hemmt.

Solche Parameter sind von grosser Wichtigkeit bei der Kontrolle von Wachstum oder Überleben von pathogenen Mikroorganismen, besonders wenn keine durchgehend kühle Lagerungstemperatur aufrechterhalten werden kann.

Humanpathogene Mikroorganismen, welche häufig im Zusammenhang mit Erkrankungen nach Rohmilch- und Käseverzehr beschrieben sind, sind u.a. *S.aureus*, *Listeria monocytogenes* oder Shigatoxin-produzierende *E.coli*. Solche Erreger können ernsthafte, schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen, die sogar tödlich enden können.

3.2 *Staphylococcus aureus*

Der Name *Staphylococcus* wurde vom schottischen Chirurgen Ogston (1882) geprägt, der die Kugelmikroben im Eiter nachgewiesen hatte. *S.aureus* gehört zur Familie der *Micrococcae* (Kloos und Schleifer, 1986). Im mikroskopischen Bild zeigen sich diese Bakterien als traubenförmig gelagerte, grampositive Kokken. *S.aureus* ist 0.8 - 1.2 μm gross, unbeweglich und bildet keine Sporen.

Obwohl er ein fakultativ anaerober Keim ist, wächst *S.aureus* auf gebräuchlichen Nährmedien am besten unter aeroben Bedingungen. Es entwickeln sich bei 37 °C erhabene Kolonien, die oftmals eine goldgelbe Farbe aufweisen.

S.aureus zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, dass sie sich im Gegensatz zu vielen anderen vegetativen Keimen noch bei einem a_w -Wert von 0.86 vermehren können, wodurch sie in Lebensmitteln mit einem bestimmten a_w -Wert-Bereich einen Selektionsvorteil haben (Troller, 1979). Ausserdem können sie über 15 - 30 Minuten Temperaturen bis 60 °C überleben und sind ziemlich resistent gegen Austrocknung (Wiesmann et al., 1986).

Abhängig von der Wachstumsphase werden viele Proteine wie Enzyme oder Toxine unterschiedlich exprimiert. Aus Sicht der Lebensmittelsicherheit haben die Staphylokokkenenterotoxine (SE) besondere Bedeutung. Bis jetzt konnten die Enterotoxine SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN und SEO identifiziert werden, ausserdem kann SEC in drei weitere Subtypen unterteilt werden: SEC1 - SEC3 (Balaban und Rasooly, 2000; Orwin et al., 2001; Ikeda et al., 2005).

Staphylokokken sind weltweit verbreitet. Die Haut und Schleimhaut von Menschen und Tieren bilden die eigentlichen Reservoirs für Staphylokokken. Man unterscheidet zwischen transienten Stämmen, die vorübergehend aus der Umgebung auf den Wirt gelangen und den residenten Stämmen, die der normalen Besiedlungsflora angehören. Pathogene Staphylokokken verursachen endogene Infektionen an ihrem Besiedlungsort und streuen von dort aus.

Die durch *S.aureus* verursachten Erkrankungen können einerseits eitrige Infektionen sein, die lokal-oberflächlich stattfinden (Furunkel, Wundinfektionen), oder tiefer reichen (Mastitis, Pneumonie). Im schlimmsten Fall können sich Infektionen auch systemisch ausbreiten und zu Sepsis oder Endokarditis führen.

Von lebensmittelhygienischer Bedeutung sind andererseits Intoxikationen, die von *S.aureus* gebildeten Toxinen ausgelöst werden können. Alle Enterotoxine sind Polypeptide, die gegenüber proteolytischen Enzymen resistent sind und daher nicht von Enzymen des Verdauungstraktes inaktiviert werden (Asperger, 1991). Ausserdem sind diese Toxine hitzestabil. Wenn die Bakterien im Endprodukt durch Erhitzungsprozesse abgetötet werden,

können Toxine immer noch enthalten und wirksam sein. Voraussetzung ist, dass sich die Toxinbildner im Ausgangsmaterial entsprechend vermehren konnten, um genügend Toxin zu produzieren (Trantner, 1990).

Die Intoxikation durch *S.aureus*-Enterotoxine äussert sich in Form einer Gastroenteritis, welche sich klinisch durch Übelkeit und Erbrechen, mit oder ohne Durchfall, und zum Teil krampfartigen Bauchschmerzen manifestiert. Typisch ist das abrupte Auftreten. Schon nach 2 - 6 Stunden machen sich die ersten Symptome bemerkbar. Die Krankheit ist in der Regel selbstlimitierend, nach 24 - 48 Stunden ist sie bei einem normalen Verlauf überwunden. In schweren Fällen kann es zu einer Hypovolämie und Hypotonie kommen (Witte, 2000).

Staphylokokken gelangen überwiegend sekundär, also durch eine Rekontamination, in die Lebensmittel (und dies wiederum vorwiegend durch den Menschen). Die hohe Keimträgerrate auf Haut und Schleimhaut lässt dies plausibel erscheinen. Besonders kritische Lebensmittel sind erfahrungsgemäss eiweissreiche oder gesalzene Produkte, welche zwangsläufig häufig manuell bearbeitet werden, beispielsweise Pasteten, Crèmen, Speiseeis, Fertigfleischgerichte oder auch Frischkäse (Hahn, 1989).

Die Inzidenz der *S.aureus*-Lebensmittel-Intoxikation ist unbekannt (hohe Dunkelziffer), aber vermutlich gehört sie zu den häufigsten Intoxikationen überhaupt (Buzby et al. 1996).

In einer englischen Arbeit wurden *S.aureus*-Stämme aus 359 Intoxikationsfällen der Jahre 1969 bis 1990 ausgewertet (Wieneke et al., 1993). 79% dieser Stämme produzierten SEA, alleine oder in Kombination mit anderen Enterotoxinen. Bei der Einteilung der Vergiftungsfälle nach konsumierten Lebensmittelgruppen lagen Fleischprodukte mit 75% klar an der Spitze, wobei die beiden häufigsten Auslöser einer Lebensmittelintoxikation Schinken oder Pouletfleisch waren. Milchprodukte waren für 8%, Fische und Meeresfrüchte für 7% aller Intoxikationen verantwortlich.

Die durch *S.aureus* ausgelösten Erkrankungen, die auf den Konsum von Milch zurückgehen, kommen demnach relativ selten vor. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass der grösste Teil der Milch einem technologischen Verarbeitungsprozess unterliegt, ausreichend gekühlt wird und als leicht verderbliches Lebensmittel in der Regel bald verzehrt wird.

S.aureus ist seit Jahrzehnten in allen Ländern mit hochentwickelter Milchwirtschaft mit Abstand der häufigste Erreger der Mastitis des Rindes. Für die Schweiz wurden Zahlen von *Schällibaum* (1996) zusammengestellt. Laut dieser Studie hat die Staphylokokkenmastitis nach der erfolgreichen Bekämpfung des „gelben Galts“ eine dominierende Rolle eingenommen. Staphylokokken wurden aus rund 40% der schweizerischen Mastitismilchproben isoliert.

Die Staphylokokken-Mastitis tritt zwar vor allem beim Rind auf, kommt aber auch bei Schaf und Ziege häufig vor. Man unterscheidet drei klinische Verlaufsformen: die perakute, die akute und die chronische Form.

Die wohl häufigste Mastitisform im Zusammenhang mit Staphylokokken ist die chronische, subklinische Manifestation. Dabei kann es sich auch um ein Bestandesproblem handeln. Insbesondere eine fehlerhafte Melkmaschinenfunktion mit Einfluss auf die Eutergesundheit begünstigt das Eindringen der Erreger in das Euter. Die Krankheitserreger dringen im Allgemeinen via Strichkanal in das Euter, daneben auch über Zitzen- und Hautverletzungen.

Von lebensmittelhygienischer Bedeutung ist die Tatsache, dass die Staphylokokken jederzeit während der Infektion mit der Milch ausgeschieden werden. Problematisch sind insbesondere die subklinischen Mastitiden, bei denen die Milch optisch unverändert erscheint und Krankheitssymptome bei der Kuh fehlen.

In Kuhmilch können humane sowie tierische *S.aureus*-Biotypen vorkommen, welche häufig Enterotoxin-Bildungsfähigkeit aufweisen (Kato et al., 1980; Stephan et al., 2001). Der Erreger muss sich aber auf ein bestimmtes Mass (mindestens 10^5 KBE/ml oder g) vermehren, um überhaupt eine genügende

Menge Enterotoxin für eine Intoxikation produzieren zu können. In Rohmilch ist dies schlecht möglich, da *S.aureus* mit der milchoriginären Flora schlecht konkurrenzieren kann.

Obwohl Butter und Speiseeis oft in Zusammenhang mit sporadischen *S.aureus*-Intoxikationen gebracht werden, sind hauptsächlich Käse, Milchpulver und zu einem geringen Anteil auch Milchdrinks und Rahm für die bekannten, grossen Ausbrüche verantwortlich (Gilmour und Harvey, 1990).

Sehr viele Veröffentlichungen zum Thema *S.aureus*-Intoxikationen sind mit dem Verzehr von Käse assoziiert (Gomez-Lucia et al., 1986; Gomez-Lucia et al., 1987; Bone et al., 1989; Gomez-Lucia et al., 1992; Meyrand et al., 1998; Vernozy-Rozand et al., 1998). Das Problem bei diesen Milchprodukten ist die Verwendung von unerhitzter Milch für bestimmte Käsesorten. Damit besteht das Risiko, dass mit *S.aureus* kontaminierte Milch verarbeitet wird. Können sich SE-bildende Stämme auf ein genügendes Mass vermehren, so können Toxinkonzentrationen entstehen, die beim Konsum des Produktes zu einer Lebensmittelintoxikation führen.

3.3 STEC

Die Gruppe der Shigatoxin-bildenden *E.coli* (STEC) gehören dem Genus *Escherichia* der Familie der *Enterobacteriaceae* an.

E.coli ist ein gramnegatives Stäbchen (1,5 x 4 µm) und kann sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen vermehren. Die meisten Stämme sind aufgrund einer typischen peritrichen Begeißelung beweglich.

STEC bilden gleiche oder chemisch sehr ähnliche Toxine wie die Ruhrerreger (Shigellen). Sie werden deshalb Shiga-Toxin (Stx)-bildende *E.coli* genannt. Im Gegensatz zu *S.aureus* werden aber die Toxine nicht im Lebensmittel, sondern während der Pathogenese im Darm gebildet. Daher spricht man nicht von einer Intoxikation, sondern von einer Infektion. Innerhalb der Shigatoxin-Familie wird zwischen verschiedenen Shigatoxin 1 (Stx 1)- und Shigatoxin 2 (Stx 2)-Varianten unterschieden.

Aufgrund ihrer Antigenstruktur werden die STEC verschiedenen Serotypen zugeordnet. Gestützt auf 160 O-Antigene, 80 K-Antigene, 50 H-Antigene und 6 Fimbrien-Antigene konnten Antigenformeln (O, K, H) und damit ein Typisierungsschema erstellt werden, welches *E.coli*-Stämme in Serovare bzw. in Serotypen einteilt (Kauffmann, 1947; Orskov et al., 1984). Die verschiedenen Serotypen unterscheiden sich u.a. in ihrer Pathogenität. Zu den virulentesten Vertretern gehört der Serotyp O157:H7.

Die Anzüchtung erfolgt auf den üblichen bakteriologischen Nährböden, wobei die Optimaltemperatur bei 37 °C liegt. Die Abgrenzung von *E.coli* zu anderen *Enterobacteriaceae* erfolgt auf einfache Weise durch die Erfassung ausgewählter biochemischer Eigenschaften.

E.coli ist ein natürlicher Darmbewohner des hinteren Abschnitts des Darmtraktes bei Mensch und Tier und macht ungefähr 1% der bakteriellen Darmflora aus. Der Keim wird mit dem Fäzes ausgeschieden und kontaminiert das Aussenmilieu, wo er unter günstigen Bedingungen längere Zeit lebensfähig bleiben kann. Der Nachweis von *E.coli* in Trinkwasser und Lebensmitteln wird deshalb als Hinweis für eine fäkale Kontamination verwendet.

Neben diesen *E.coli*-Keimen, die als Kommensalen im Intestinaltrakt von Mensch und Tier leben, finden sich im Darm auch *E.coli* mit pathogenen Eigenschaften. Aus lebensmittelhygienischer Sicht haben STEC besondere Bedeutung (Doyle et al, 1987; Chapman et al., 1993). Beim Menschen gehören STEC weltweit neben Salmonellen, Campylobacter und Yersinien zu den wichtigsten Erregern von „foodborne diseases“.

Als Erregerreservoir für STEC werden hauptsächlich Wiederkäuer angesehen (Karmali, 1989; Wilson et al., 1992). Aber auch von anderen Haustieren wie Schwein, Hund und Katze konnten STEC isoliert werden (Beutin et al., 1995). Selbst in Möwenkot wurde STEC nachgewiesen (Wallace et al., 1997). Verschiedene Studien in der Schweiz ergaben, dass in schweizer Rinder-, Kälber- und Schafherden regelmässig STEC aus Kotproben isoliert werden kann. Die dabei ermittelte Prävalenz lag im Bereich von 6% bis 60% (Burnens et al, 1995; Busato et al., 1998; Stephan et al., 2000).

Selbst gesunde Erwachsene können STEC zeitweise ausscheiden (Baljer et al., 1998; Stephan et al., 1999).

Im Vergleich zu anderen pathogenen *E.coli* sind STEC in der Lage, sehr verschiedene Krankheitsbilder hervorzurufen. Die Lebensmittelinfektion äussert sich als leichte, unkomplizierte Durchfallerkrankung bis hin zur hämorrhagischen Colitis (HC) mit schweren blutigen Durchfällen. Bei bestimmten Risikogruppen (Kleinkinder, ältere Menschen, Immunsupprimierte) kann die HC in lebensbedrohliche Komplikationen wie dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), mit dem Leitsymptom eines akuten Nierenversagens, übergehen (Griffin et al., 1988).

Der Mensch infiziert sich oral, entweder über erregerausscheidende Tiere und Mitmenschen (Schmutz-, Schmierinfektion) oder direkt über den Verzehr fäkal kontaminierter Lebensmittel.

Eine genaue minimale Infektionsdosis (MID) ist unbekannt. Es scheint jedoch, dass bereits eine geringe Keimmenge zur Infektion führen kann (Willshaw et al., 1994; Tuttle et al., 1999). Eine mögliche Begründung liegt darin, dass vielen STEC-Stämmen eine erhöhte Säuretoleranz eigen ist, wodurch diese Stämme die Magen- (pH 1 - 3) und Dünndarmpassage (pH 4,5 - 7) überstehen (Lin et al., 1996; Law, 2000).

In den USA wird als primäre Ursache unzureichend gegartes Rindfleisch in Form von Hackfleischprodukten (v.a. Hamburger), Roastbeef etc. erwähnt (Bell et al, 1994; Rodrigue et al., 1995). In der Literatur werden aber auch Krankheitsausbrüche nach dem Verzehr von Rohmilch, rekontaminierter pasteurisierter Milch, Rohmilchkäse, Joghurt, Apfelwein, Salate und Wasser beschrieben (Bockemühl et al, 1990; Doyle, 1991; Chapman et al., 1993; Zhao et al., 1993; Morgan et al., 1993; Upton et al., 1994; Keene et al., 1997; Hilborn et al., 2000).

In Europa dürfte im Gegensatz zu den USA Rohmilch eine grössere Bedeutung haben (Bockemühl et al., 1996). Ein weiterer Unterschied besteht in der Nachweishäufigkeit der unterschiedlichen Serotypen. Während *E.coli*

O157:H7 der vorwiegende Serotyp ist, der von Patienten in den USA, Kanada und Japan bei grösseren Ausbrüchen isoliert werden konnte, waren für Ausbrüche und sporadische Erkrankungen in Europa andere Serotypen (non-O157:H7) verantwortlich (Riley et al., 1983; Bockemühl et al., 1996).

In der Literatur sind einige Infektionen des Menschen mit *E.coli* O157:H7 beschrieben, die auf den Genuss von Rohmilch zurückzuführen sind. So in nordamerikanischen Studien aus den 80er- und 90er-Jahren (Martin et al., 1986; Borczyk et al., 1987; Wells et al., 1991; Wilson et al., 1996; Keene et al., 1997). Ebenfalls wird von Ausbrüchen in Europa berichtet: darunter in England und Schottland, in Finnland und Österreich (CDSC, 1996 und 1999; Allerberger et al., 2001; International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians, 2000; Reid, 2001; Lahti et al., 2002).

Auch liegen Berichte über den Ausbruch von Erkrankungen vor, die auf den Verzehr von Milchprodukten wie Käse, Butter und Joghurt zurückzuführen sind. Im Jahr 1998 erkrankten in Wisconsin, USA 55 Personen, nachdem sie mit *E.coli* O157:H7 kontaminierten Käse gegessen hatten (CDC, 2000). Aber auch aus Grossbritannien sind Fälle bekannt (Morgan et al., 1993; CDSC, 1998 und 1999; Reid, 2001).

3.4 Listerien

Die nach dem schottischen Chirurgen Sir Joseph Lister (1827 - 1912) benannte Gattung Listerien umfasst sechs Spezies, darunter *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.grayi*, *L.seeligeri* und *L.welshimeri*.

Listerien sind grampositive, fakultativ-anaerobe Stäbchen mit einer Breite von 0,4 bis 0,5 µm und einer Länge von 0,5 bis 2 µm (Seeliger et al., 1986), die keine Sporen ausbilden, sich aber bei Temperaturen zwischen 20° C und 25° C mit Hilfe von bis zu 5 µm langen Geisseln bewegen können. Unbeweglich sind sie aber bei Temperaturen von 30° C bis 37° C, ihrer optimalen Wachstumstemperatur (Peel et al., 1988).

Aufgrund ihres psychrotrophen Wachstums vermehren sich Listerien auch bei Temperaturen tiefer als 4° C. Das Wachstum findet allerdings im Vergleich zu höheren Temperaturen verlangsamt statt. Es ist aber aus lebensmittelhygienischer Sicht zu berücksichtigen, dass bei Kühlschranktemperaturen eine Vermehrung von Listerien stattfindet.

An ihre Umgebung stellen Listerien keine anspruchsvollen Bedingungen. Sie können im Boden, Wasser, Kot, Milch und Silage überleben, ebenfalls in Salzkonzentrationen von bis zu 10% (Seeliger, 1961).

Während der Nachweis in klinischem Material wie Blut, Fruchtwasser oder Liquor infolge der normalerweise sterilen Natur dieser Flüssigkeiten durch Ausplattieren auf gängige Nährmedien möglich ist, gestaltet sich diese Nachweismethode bei der Untersuchung von Stuhl-, Umwelt- oder Nahrungsmittelproben wesentlich schwieriger, da diese Proben eine hohe Begleitflora aufweisen (Schuchat et al., 1991). Verschiedene Autoren empfehlen deshalb die Verwendung von Selektivnährmedien, um die Begleitflora zu unterdrücken (Klinger, 1988; Lovett, 1988; McClain et al., 1988; Van-Netten et al., 1989).

In lebensmittelverarbeitenden Betrieben sind Listerien als sogenannte Hauskeime gefürchtet und können zu einer Rekontamination derjenigen Lebensmittel führen, die bereits einem Listerien abtötenden Herstellungsprozess unterzogen wurden (Senczek et al., 2000). Somit ist eine Übertragung auf zahlreiche Lebensmittel (Geflügel, Frischfleisch, Milch, Käse, Gemüse, Früchte, Fisch) möglich und auch nachgewiesen (Fenlon et al., 1996; Johansson et al., 1999).

Auf allen Stufen der Lebensmittelproduktionskette werden Listerien allgemein, und *L.monocytogenes* im speziellen aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens auch als Hygieneindikatoren herangezogen.

Die Fähigkeit, eine Listerienerkrankung auszulösen, hat allein *L.monocytogenes*, obwohl auch *L.ivanovii* als möglicher Krankheitserreger beim Menschen angesehen wird (World Health Organisation, WHO, 1988). Von Listeriose betroffene Menschen sind meistens Personen mit einem

momentan oder permanent beeinträchtigten Immunsystem. Darunter fallen v.a. Neugeborene, Schwangere, ältere Personen und Immunsupprimierte (Barza, 1985). Immunsuppression kann bei Personen ausgelöst werden, die Cortikosteroide einnehmen oder unter Chemotherapie stehen, aber auch Menschen mit Zirrhose, AIDS, Diabetes mellitus, Alkoholismus, kardiovaskulären und renalen Erkrankungen gehören zur Risikogruppe (Taege, 1999). Gesunde Personen zeigen in der Regel nach der Aufnahme von Listerien keine Symptome oder leiden nur vorübergehend unter Magen-Darm-Beschwerden oder grippeähnlichen Symptomen. Diese Form wird auch als nicht-invasive Listeriose bezeichnet (Schuchart et al., 1991). Beim Menschen werden vier verschiedene Krankheitsbilder unterschieden:

- *Schwangerschaftslisteriose / neonatale Listeriose:*

Bei der Mutter verläuft die Erkrankung, wenn überhaupt, unter einem unauffälligen grippeähnlichen Bild. Da der Erreger eine Affinität zur Plazenta besitzt, kann es beim Foeten zu einer Granulomatosis infantiseptica mit Aborten, Totgeburten oder Geburt von lebensschwachen Säuglingen kommen. Wird die Krankheit frühzeitig erkannt, kann eine erfolgreiche Behandlung eingeleitet werden und das Kind gesund zur Welt kommen (Taege, 1999).

- *Meningoencephalitis:*

Die Hirnhautentzündung geht mit neurologischen Symptomen einher.

- *Septikämie:*

Septikämie geht mit Fieber und allgemeinen Symptomen einher.

- *Gastroenteritis:*

Wurde erstmals 1996 beschrieben (Salamina et al., 1996).

Die minimale Infektionsdosis (MID) ist unbekannt und weitgehend abhängig vom Immunstatus (Farber et al., 1991). Die Inkubationszeit wird mit 3 bis 90 Tagen angenommen (Robert Koch Institut, 1999).

Die Aufnahme des Erregers erfolgt hauptsächlich durch den Verzehr von kontaminierten tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln, während derer Verarbeitung es zu einer Re- oder Kreuzkontamination gekommen ist (so zum Beispiel in der Rinde von Rohmilchweichkäse). Bei Lebensmitteln, die aus rohem Fleisch oder Rohmilch hergestellt werden, ist aber nicht auszuschliessen, dass bereits das Ausgangsmaterial Ursache für ein Vorkommen von Listerien im Endprodukt ist.

Nach einer Zusammenstellung der Europäischen Kommission vom September 1999 wurden bis dahin weltweit 21 grosse Ausbrüche beschrieben, in deren Verlauf es zu mehr als 2000 zum Teil schweren Erkrankungen und annähernd 300 Todesfällen kam. Die wohl folgenschwerste Listeriose trat 1992 in Frankreich mit 279 Erkrankungen und 85 Todesfällen auf und konnte auf den Verzehr von Schweinezunge in Aspic zurückgeführt werden (Jacquet et al., 1995). Ebenfalls auf solche Produkte zurückzuführen sind Fälle anfangs des Jahres 2000 in Frankreich (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, 2000). Ein Ausbruch in North Carolina, USA im Jahr 2000 liess sich auf den Konsum von Rohmilchweichkäse zurückführen (MacDonald et al., 2005).

Die Listeriose-Situation in der Schweiz hat sich in den 90er-Jahren auf einem endemischen Niveau stabilisiert, das demjenigen von anderen industrialisierten Ländern entspricht. Die jährliche Anzahl der bestätigten Listeriosen, die zwischen 1991 und 2001 entweder dem Bundesamt für Gesundheit (BAG) oder dem „Centre national de référence des Listerias“ (CNRL) oder beiden gemeldet wurde, schwankte zwischen 22 und 54 Fällen. Dies entspricht jährlichen Melderaten zwischen 3 und 7 Fällen pro Million Einwohner. In dieser Zeit sind in der Schweiz keine Ausbrüche beobachtet worden.

Der aktuellste Fall einer Listeriose ereignete sich in der Schweiz im Juni 2005. Nach dem Konsum von Tomme-Weichkäse im Kanton Neuenburg sind 10 Personen erkrankt. Drei ältere Personen starben, gleichzeitig erlitten zwei Frauen eine Fehlgeburt (Tages-Anzeiger, 7. Juni 2005; sda, 9. Juni 2005).

Der Grund dafür, dass diese Krankheit trotz nur ca. 30 Fällen pro Jahr solch hohe Wellen wirft, dürfte ihre relativ hohe Letalität sein. Je nach Studie beträgt sie zwischen 13% und 70% (Jemmi, 2002)

4 Material und Methoden

4.1 Milchbetriebe und Käserei

Zur Untersuchung kamen Rohmilchproben aus 11 Milchwirtschaftsbetrieben aus dem Oberwallis (Goms). Die eine Genossenschaft bildenden Kleinbetriebe weisen einen Tierbestand von 10 bis 24 Milchkühen auf. Die Genossenschaft produziert nach den Richtlinien des Knospe-Labels.

Täglich beliefern diese Betriebe die Genossenschafts-eigene Käserei (Abbildung 1), in der ausschliesslich die Milch dieser 11 Betriebe verarbeitet wird. Neben der Herstellung verschiedener Milchprodukte wie Joghurt und Butter steht besonders die Produktion von Rohmilchkäse im Vordergrund. Parallel zur Untersuchung der Betriebsmilch kam im Rahmen dieser Arbeit auch die Beprobung und Untersuchung des Bio-Gomser 11 (Abbildung 2), ein halbharter Rohmilchkäse, der nur in dieser Region produziert wird.

4.2 Käseherstellung

Die zur Käseherstellung verwendete Milch besteht aus zwei Morgengemelken und einem Abendgemelk. Die 24 bis 48 Stunden (ab ältestem Gemelk) unter 5 °C gelagerte Rohmilch wird eine Stunde bei 32 °C vorgewärmt, bevor eine Kulturmenge von 2 - 2.5 Einheiten Säuerungskulturen / 100 lt Milch und 0.7 – 1.0 Einheiten Geschmackskulturen / 100 lt Milch beigegeben werden. Nach Verstreichen der Dickungszeit (30 - 35 min) und dem Vorkäsen (inkl. Bruchbereitung, 30 min) wird der Bruch für 30 - 35 min bei 43 °C gebrannt, danach ausgerührt (25 - 35 min) und unter Ablassen der Molke in Plastikzylinder abgefüllt. Darin wird der Bruch in drei Stufen gepresst, bevor der Käselaib mit einem pH-Wert von 5.05 - 5.1 im Salzbad 24 Stunden lang bei 11 - 13 °C aufbewahrt wird, wobei die Salzbadstärke 20 - 21 °Bè beträgt. Bei einem Kellerklima von 10 - 11 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 - 94% wird der Käse anschliessend für mindestens 60 Tage gelagert.

4.3 Probenentnahme

Über den Zeitraum eines Jahres (Februar 2004 bis Februar 2005) sind insgesamt 283 Betriebsmilchproben der 11 Biobetriebe untersucht worden. Die Proben wurden in wöchentlichen Abständen immer am selben Wochentag entnommen. Ca. 200 ml Rohmilch wurde direkt auf den jeweiligen Höfen in sterile Probengläser abgefüllt und bis zur Untersuchung am folgenden Tag am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene bei 4 °C aufbewahrt.

Gleichentags wurde auch eine Sammelmilchprobe in der Käserei erhoben. Diese Milch war jeweils eine Mischung aller in der Käserei abgelieferten Bestandesmilchen, also aller 11 Betriebe. Diese Sammelmilch wurde jeweils am folgenden Tag zur Herstellung des ebenfalls beprobten Käses verwendet. Während der Untersuchungsperiode wurden 37 Sammelmilchproben entnommen.

In die Untersuchung einbezogen wurden auch 46 Käselaike aus 46 unterschiedlichen Herstellungschargen. Käseteigproben wurden am Tag 0 (Bruch), 7, 14, 21, 28, 35, 63 und 91 entnommen. Für die mikrobiologische Untersuchung des Käses wurde ausschliesslich Teigmaterial (kein Rindenmaterial) verwendet, das mit einem gereinigten und desinfizierten Käsebohrer entnommen wurde (Abbildung 3).

Zusätzliche 52 Sammelmilchproben stammen von vier verschiedenen Alpbetrieben, die während der Sommermonate (Juli und August) von den gleichen 11 Betrieben bewirtschaftet wurden.

Zudem wurden im Abstand von ca. 2 Monaten insgesamt 7 Proben aus dem Salzbad entnommen, in dem der Käse gelagert wird.

4.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Aufbereitung der Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgte innerhalb 36 Stunden nach der Probenentnahme.

Für die quantitativen Untersuchungen der Rohmilch wurde dazu eine dezimale Verdünnungsreihe (bis 1:1000) in 0.85% NaCl-Pepton hergestellt.

Von den Käseproben wurde jeweils 10 g in 90 ml 0.85% NaCl-Pepton in Stomacherbeuteln (Model 400, 6041/5, Seward Ltd., London, UK) abgefüllt und im Stomacher (Stomacher Lab Blender 400, Seward Ltd.) 60 s lang homogenisiert. Aus der daraus hergestellten Erstverdünnung wurden weitere Verdünnungen mit 0.85% NaCl-Pepton hergestellt (bis 1:10 000 000).

Die Kolonien wurden jeweils auf einem Colony Counter ausgezählt und die Keimzahl (in KBE/ml Milchprobe bzw. in KBE/g Käseprobe) daraus berechnet.

4.4.1 Aerobe und anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl Milch

Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) wurde mittels Gussplattenverfahren ermittelt. Jeweils 1 ml der unverdünnten Rohmilchprobe und 1 ml der daraus hergestellten Verdünnungsstufen (bis 1:1'000) wurden mit 15 ml Platecount-Agar (PC-Agar, Oxoid Ltd., Hampshire, UK) vermischt und bei 30 °C für 72 h aerob inkubiert.

Zur Ermittlung der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahl wurde 1 ml der unverdünnten Rohmilchprobe und 1 ml der hergestellten Verdünnungsstufen (bis 1:100) entnommen und mit 15 ml Platecount-Agar vermischt. Die Bebrütung erfolgte für 72 h bei 30 °C in anaerobem Milieu.

4.4.2 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl Käse

Zur Ermittlung der Gesamtkeimzahl der Käseproben wurde das Spatelverfahren auf Platecount-Agar (PC-Agar, Oxoid Ltd.) angewandt.

Diese Platten wurden mit 0,1 ml der bereits hergestellten Verdünnungsstufen 1:10 bis 1:10 000 000 beimpft. Die Platten wurden 72 h bei 30 °C aerob bebrütet.

4.4.3 Nachweis der *Enterobacteriaceae* in der Milch

Jeweils 1 ml der unverdünnten Rohmilchprobe und 1 ml der dazugehörigen Verdünnungsstufe 1:10 und 1:100 wurde mit 15 ml Violet-Red-Bile Glucose-Agar (VRBG-Agar, BBL, Cockeysville, USA) vermischt (Gussplattentechnik).

Nach Verfestigung des Agars wurde eine Overlayerschicht mit 10 ml VRBG-Agar darüber gegossen.

Die Agarplatten wurden während 48 h bei 30 °C in anaerobem Milieu inkubiert, danach die typischen, roten Kolonien mit oder ohne Hofbildung ausgezählt und als Anzahl *Enterobacteriaceae*/ml Milch berechnet.

4.4.4 Nachweis der *Enterobacteriaceae* im Käse

Aus der bereits hergestellten 1:10-Verdünnungsstufe wurden weitere zwei Verdünnungsstufen (bis 1:1000) zur Beimpfung von Violet-Red-Bile Glucose-Agar (VRBG-Agar, BBL) Nährmedien benutzt (Spatelverfahren). Die Medien wurden danach 48 h bei 30 °C in anaerobem Milieu inkubiert.

4.4.5 Nachweis und weitergehende Charakterisierung von *Staphylococcus aureus* in der Milch, im Käse und im Salzbad

4.4.5.1 Keimzählung

0,1 ml der Rohmilchprobe und der Verdünnungsstufe 1:10 wurden zur Bestimmung der *S.aureus* Keimzahlen auf RPF-Medium (Grundmedium nach Baird-Parker ohne Eigelbemulsion mit Zusatz von Rabbit-Plasma-Fibrinogen-Supplement, Oxoid CM275 mit RPF-Supplement Sedia 2000-0100; Oxoid Ltd.) verbracht und mit sterilen Spateln ausgestrichen. Dieselbe Methode wurde mit 0,1 ml der beiden tiefsten Verdünnungsstufen der Käseproben durchgeführt. Von der Salzbadprobe wurde 0,1 ml unverdünnt auf RPF-Medium ausgespatelt, zudem die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100. Die Bebrütung erfolgte für 48 h bei 37 °C.

Die charakteristischen, koagulase-positiven Kolonien (schwarz-graue, glänzende, gewölbte Kolonien mit umgebendem, opakem Präzipitationshof) wurden gezählt und daraus die Keimzahl (in KBE/ml Milch bzw. KBE/g Käse) berechnet.

4.4.5.2 Weitergehende Untersuchungen

Abhängig von der Koloniemorphologie und der Koagulasereaktion auf dem RPF-Medium wurden ein oder mehrere Isolate pro Rohmilchprobe, pro Käseprobe und Salzbadprobe entnommen. Diejenigen Isolate der Käseproben, die am 7. Reifetag gesammelt wurden, wurden weiter auf ihre Enterotoxinbildungsfähigkeit hin untersucht. Insgesamt wurden 51 Isolate von 22 unterschiedlichen Käsechargen in diese Untersuchungen einbezogen.

Weiter wurden an vier zufällig ausgewählten Untersuchungstagen (in Woche 5, 8, 15 und 20) insgesamt 90 *S.aureus*-Isolate von Betrieb E, H, I, K und der Sammelmilch gesammelt und genotypisiert. Ebenfalls wurden die Isolate der gesamten Stufenkontrollen der daraus hergestellten Käsechargen gesammelt. 5 der 90 Isolate stammen von Salzbadproben, die an zwei der vier ausgewählten Beprobungstage (in Woche 15 und 20) entnommen wurden.

DNA-Extraktion

S. aureus-DNA wurde nach der Methode von *Hesselbarth* und *Schwarz* extrahiert (1995). Vorbereitend wurde eine *S. aureus* Kolonie in 10 ml BHI (Brain Heart Broth; Oxoid CM225, Hampshire, UK) gegeben und über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Die Nährbouillon wurde daraufhin für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 5 ml TE-Puffer (10:1) gelöst.

400 µl dieser Lösung wurden mit 22.5 µl TEN-Puffer (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.4), 22.5 µl SDS (20%) und 15 µl Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das Probenmaterial wurde anschliessend mit 400 µl Phenol (Roti®-Phenol, Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D) durch 100-maliges Schwenken vermischt, 20 Min. auf Eis gekühlt und dann für 5 Min. bei 10'000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde mit abgeschnittenen Spitzen in neue Tubes überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Der so erhaltene DNA-Überstand wurde mit 400 µl IAC (Isoamylalkohol-Chloroform 1:24, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) versetzt, durch

Schwenken vermischt und zentrifugiert (5 Min., 10'000 U/min, 4 °C), wobei auch dieser Schritt einmal wiederholt wurde.

Durch die Zugabe von 1/10 Volumen (40 µl) Natriumacetat (3 M, pH 4.8) und dem doppelten Volumen (800 µl) eiskalten absoluten Ethanol konnte die DNA über 30 Min. bei -70 °C ausgefällt werden. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt (30 Min., 15'000 U/min, 4 °C) wurde die DNA pelletiert und danach mit eiskaltem 70%-igen Ethanol gewaschen. Abschliessend wurde nochmals zentrifugiert (15 Min., 15'000 U/min, 4 °C) und abpipettiert, so dass die extrahierte DNA auf dem Boden des Tubes pelletiert vorlag. Das Pellet wurde in einem Vakuumtrockner (Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, CH) gut getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert.

***S.aureus*-spezifische PCR**

Ein *S. aureus*-spezifischer DNA-Abschnitt der 16S-23S rRNA Region wurde dazu mit dem Primerpaar Staur4 (5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3') und Staur6 (5'-AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC-3') nachgewiesen (Forsman et al., 1997; Straub et al., 1999). Der PCR-Mastermix (50 µl) enthielt 0.3 µl von jedem Primer (20 pmol), 0.1 µl dNTP (10 mM; Promega, Madison, USA), 5.0 µl 10x Puffer (Promega, Madison, USA) 0.4 µl Taq DNA Polymerase (5U µl⁻¹; Promega, Madison, USA) und 43.4 µl Aqua bidest. Schliesslich wurde 1 µl der präparierten DNA dazupipettiert. Die Amplifikation erfolgte bei folgendem Cycler-Programm: Denaturation für 1x 3 Min. bei 95 °C, gefolgt von 38x Zyklen für 40 Sek. bei 94 °C, 60 Sek. bei 64 °C, 75 Sek. bei 72 °C, und einem abschliessenden Extensionsschritt von 3 Min. bei 72 °C.

Die Amplifikationsprodukte wurden im Anschluss an die PCR in einer Gel-Elektrophorese (1.5% Agarosegel) dargestellt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Als Längenmarker wurde ein 100 bp-Marker (Roche Diagnostics GmbH) benutzt.

Multiplex-PCR zur Identifikation von Enterotoxin-Genen (*sea* bis *see*)

Ausgehend von der extrahierten DNA wurde ein Multiplex-PCR-Ansatz gemacht, um die Staphylokokken Enterotoxin-Gene A bis E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* und *see*) nachzuweisen.

Der Mastermix für den Nachweis der Enterotoxingene A bis E enthielt die Primerpaare GSEAR-1/GSEAR-2 für das Enterotoxin A, GSEBR-1/GSEBR-2 für das Enterotoxin B, GSECR-1/GSECR-2 für das Enterotoxin C, GSEDR-1/GSEDR-2 für das Enterotoxin D und GSEER-1/GSEER-2 für das Enterotoxin E (Mehrotra et al., 2000). 2 µl Probenmaterial aus der DNA-Extraktion wurden in 38.75 µl Aqua bidest. resuspendiert; die Amplifizierung erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl. Der Reaktionsmix enthielt je 0.3 µl (20 pmol) jedes Primers (SEA- bis SEE-Primerpaare), 1 µl dNTP (200 µM), 5 µl 10x Puffer (Promega, Madison, USA) und 0.25 µl Taq-DNA-Polymerase (5U µl⁻¹; Promega, Madison, USA).

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm: 1x 5 Min. 94 °C, 35x 2 Min. mit 94 °C, 2 Min. bei 57 °C, 1 Min. bei 72 °C und einem abschliessenden Extensionsschritt bei 72 °C für 7 Min. (Mehrotra et al., 2000).

Die Auftrennung der erhaltenen Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Elektrophorese auf einem 1.5% Agarosegel (ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA) in TBE-Puffer. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Quantity One, Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italien) wurden die Resultate dokumentiert. Als Längenmarker wurde ein 100 bp-Marker (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) benutzt.

PCR-Amplifikation des Koagulase-Gens (*coa*)

Nach der beschriebenen *S.aureus* DNA-Aufbereitung wurden 2 µl des Probenmaterials mit 42 µl Aqua dest. gemischt und 6 µl Reaktionsmix dazupipettiert. Der Mastermix (50 µl) besteht aus dem Oligonukleotid-

Primerpaar Coa1 (5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3') und Coa2 (5'-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C-3'), wovon jeweils 0.4 µl (75pmol) dazupipettiert wurden, aus 1 µl (50µM) dNTP, 5 µl 10x Puffer (Promega, Madison, USA) und aus 0.25 µl Taq-DNA-Polymerase (5U µl⁻¹; Promega, Madison, USA).

Die Amplifizierung erfolgte in einem Hybaid Thermocycler (Catalys AG, Wallisellen, CH). Das Cyclerprogramm bestand aus einem initialen Denaturationsschritt bei 94 °C für 1x 4 Min., gefolgt von 30x 1 Min. bei 94 °C, 1 Min. bei 58 °C, 1 Min. bei 72 °C, und einem abschliessenden Extensionsschritt bei 72 °C für 5 Min. (Hookey et al., 1998).

Die amplifizierten Produkte wurden schliesslich mittels Gel-Elektrophorese in einem 1.5% Agarosegel (ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA) aufgetrennt, im Ethidiumbromid-Bad (0.5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

Genotypisierung von *S.aureus*

Eine CRP(coagulase gene restriction profile)-Analyse der positiven Stämme, die von *Chiou et al.* (2000) beschrieben wurde, wurde durchgeführt. Die *coa*-Gene wurden amplifiziert und über Nacht mit dem Restriktionsenzym *AluI* verdaut (Promega, Madison, WI, USA). Die DNA-Fragmente wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt.

4.4.6 Nachweis der Milchsäurebildner im Käse

Zur Ermittlung der Keimzahl der Milchsäurebildner in den Käseproben wurde das Spatelverfahren auf MRS-Platten (Oxoid Ltd.) angewandt. Dafür wurden 0,1 ml der Verdünnungsstufen bis 1:10 000 000 auf MRS-Platten verbracht und ausgespatelt. Diese Platten wurden während 72 h bei 25 °C in aerobem Milieu bebrütet.

4.4.7 Nachweis und weitergehende Charakterisierung Shigatoxin-bildender *E.coli* (STEC)

4.4.7.1 PCR

Zu 25 ml Rohmilch wurden im Stomacher-Beutel (Model 400, 6041/5, Seward Ltd.) 225 ml Brilliantgrün-Bouillon (BGB, Becton Dickinson Microbiology Systems, Md., USA) zugesetzt.

Der Käseprobe wurde für denselben Nachweis 10 g entnommen und mit 90 ml Brilliantgrün-Bouillon (BGB, Becton Dickinson Microbiology Systems) im Stomacherbeutel homogenisiert. Diese Proben wurden alle bei einer Temperatur von 37 °C während 24 h inkubiert. Von jeder Anreicherung wurden mittels steriler Einweg-Plastiköse (731170, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A) Blutplatten (Columbia Blood Agar, Difco Laboratories, Detroit, USA; Schafblut defibrilliert steril, Oxoid Ltd.) beimpft und diese bei 37 °C für 24 h bebrütet. Anschliessend erfolgte eine Abschwemmung der Kolonien von den inkubierten Blutplatten mittels 0.85% NaCl-Lösung (2 ml).

Zwei Mikroliter jeder Abschwemmung wurden in 42 µl Aqua bidest suspendiert, bei 100 °C während 10 min. gekocht und mittels der PCR und dem von *Burnens* et al. (1995) beschriebenen Primerpaar, upper primer 5'-ATT GAG CAA AAT AAT TTA TAT GTG-3' und lower primer 5'-TGA TGA TGG CAA TTC AGT AT-3' auf das Vorkommen Shigatoxin-bildender *E. coli* geprüft.

Die Amplifizierung erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl [200 µM dNTPs, 30 pmol von jedem Primer, 5 µl 10-fach konzentrierter Polymerase Synthesis Buffer mit 15 mM MgCl₂ und 2.5 U Taq-Polymerase (PCR Core system I, M 7660, Promega, Madison, USA)] in einem T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D) mit folgendem Programm: 1 x 120 s bei 94 °C, 35 x 60 s bei 94 °C, 60 s bei 52 °C, 60 s bei 74 °C und anschliessender letzter Extension bei 72 °C während 120 s.

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Elektrophorese auf einem 0.8% Agarosegel (Boehringer Mannheim, Mannheim, D) in 0.5

TBE-Puffer (0.9 M Tris base, 0.9 M Borsäure, 0.02 M EDTA). Die Gele wurden mit Ethidiumbromidlösung (3 µl/100 ml TBE-Puffer) gefärbt.

4.4.7.2 Isolierung und Charakterisierung von STEC-Stämmen

Zur Isolierung von STEC-Stämmen wurde eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Dafür wurden 5 zufällig ausgewählte *stx*-positive Proben auf Schafblutagar (Oxoid Ltd.) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden auf eine Nylonmembran (Roche) übertragen und nach den Standardmethoden lysiert. Nach Waschen und Prähybridisierung in Dig-Easy-Hyb-Lösung (Roche) bei 37 °C für 30 min. erfolgte die Hybridisierung mit *stx*-DNA-Sonden über Nacht bei 42 °C. Die Membran wurde in vorgewärmter Waschlösung I und II gewaschen und zur Sichtbarmachung der Hybridisierungsstellen mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper in Blockingpuffer inkubiert und mit der Farbsubstratlösung (400 µl NBT/BCIP Stock Solution in 20 ml Detektionspuffer) nach den Anweisungen des Herstellers (Roche) inkubiert.

Mittels weiterer PCRs wurden die Stämme anschliessend auf die Art des Shigatoxins (Stx1 bzw. Stx2) sowie das Vorkommen des *eae*-Gens und des *hly*-Gens untersucht. Promerpaare und PCR-Bedingungen sind in der Literatur beschrieben (Schmidt et al., 1994; Schmidt et al., 1995; Rüssmann et al., 1995; Yamamoto et al., 1997). Die Serotypisierung der Stämme erfolgte am Laboratorio de Referencia de E.coli (LREC) in Lugo, Spanien.

4.4.8 Nachweis von *Listeria* spp.

Es wurde ein qualitativer Nachweis von Listerien mittels Anreicherungsverfahren durchgeführt.

Erste Anreicherung

25 ml jeder Milchprobe und 25 g jeder Käseprobe wurde im Verhältnis 1:10 in Half-Fraser-Broth Bouillon (Oxoid Ltd.) homogenisiert und 24 h bei 30 °C

inkubiert. Folgend wurden Oxford-Platten (Oxoid CM856, Oxoid Ltd.) und Palcam-Platten (Merck 11755, Merck Eurolab AG, Dietikon, CH) mit inkubiertem Probenmaterial mit Hilfe einer sterilen Einweg-Plastiköse (731170, Greiner Bio-One GmbH) beimpft. Beide Selektivplatten wurden 48 h bei 37 °C bebrütet.

Zweite Anreicherung

Aus der 1. Anreicherung des in Half-Fraser-Broth inkubierten Probenmaterials wurden zusätzlich 0,1 ml entnommen und für die 2. Anreicherung in mit 10 ml Fraser-Broth (Oxoid Ltd.) gefüllten Röhrchen verbracht und während 24 h bei 37 °C bebrütet. Von dieser 2. Anreicherung wurden mittels Einweg-Plastikösen Oxford- und Palcam-Platten beimpft. Diese wurden bei 37 °C 48 h bebrütet.

Identifikation

Die Selektivplatten Palcam und Oxford wurden auf die für Listerien typischen Kolonien überprüft.

Auf Palcam-Agar zeigen charakteristische Kolonien eine grüngraue Farbe mit dunklem Zentrum und schwarzem Hof, sind rund und flach gewölbt und glänzend mit einem Durchmesser von 1,5 bis 2 mm.

Auf Oxford-Agar sind die Kolonien braungrau mit einem Durchmesser von bis zu 1,5 mm und mit einem Hof (Aeskulinspaltung). Sie sind rund, flach gewölbt, in der Regel schwach zentral eingezogen und glänzend.

4.5 Messung ausgewählter Parameter im Käse

4.5.1 a_w -Wert-Bestimmung im Käse

Von den 46 untersuchten Käsechargen wurden 4 zufällig ausgewählt (Charge 14, 21, 42 und 48) und daraus an den jeweiligen Probeentnahmetagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 63 und 91 zusätzlich 10 g Käseteig mit dem Käsebohrer entnommen. Dieses Käsematerial wurde jeweils in Plastikdöschen verbracht

und in ein A_w -Wert-Messgerät (novasina aw-center, Defensor AG, Pfäffikon, Schweiz) verbracht. Die Ablesung der Messwerte erfolgte nach 6 bis 8 Stunden und bei einer Temperatur von 25 °C.

4.5.2 pH-Wert-Bestimmung im Käse

Von den 46 in die Untersuchung einbezogenen Käsechargen wurden zufällig 19 ausgesucht. An den durchgeführten Probeentnahmetagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 63, 91 wurde mit einem pH-Meter (Portamess 654, Knick, Hügli Labortec AG, Abtwil, Schweiz) die pH-Messung an diesen Chargen durchgeführt. Die Messung erfolgte ca. 3 cm tief im Teigmaterial.

5 Ergebnisse

5.1 Quantitative mikrobiologische Untersuchungen von Rohmilch

5.1.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ)

5.1.1.1 GKZ-Einzelergebnisse geordnet nach Betrieben

Insgesamt lagen die GKZ-Einzelergebnisse der Rohmilchproben zwischen 2.2 \log_{10} KBE/ml in Betrieb G und 4.9 \log_{10} KBE/ml in Betrieb I (Tabelle 1). Am höchsten lag der Mittelwert der logarithmierten GKZ im Betrieb E (3.8 \log_{10} KBE/ml) und am tiefsten im Betrieb G (2.8 \log_{10} KBE/ml). Die Streuung innerhalb der jeweiligen Betriebe schwankte zwischen 0.5 \log_{10} -Stufen im Betrieb B und 2.0 \log_{10} -Stufen im Betrieb I.

Tabelle 1: Minimum, Maximum und Mittelwert der \log_{10} GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilchprobe

		Minimum (\log_{10} KBE/ml)	Maximum (\log_{10} KBE/ml)	Mittelwert (\log_{10} KBE/ml)
Betrieb A	(n=37)	2.85	3.60	3.29
Betrieb B	(n=36)	3.20	3.69	3.48
Betrieb C	(n=36)	2.67	4.04	3.25
Betrieb D	(n=39)	2.96	4.18	3.43
Betrieb E	(n=36)	3.30	4.78	3.76
Betrieb F	(n=34)	2.92	4.15	3.44
Betrieb G	(n=36)	2.15	3.96	2.79
Betrieb H	(n=36)	2.26	3.74	3.05
Betrieb I	(n=38)	2.85	4.88	3.52
Betrieb J	(n=36)	2.94	3.79	3.40
Betrieb K	(n=38)	3.15	3.96	3.52
Sammelmilch	(n=36)	2.66	5.32	3.66

5.1.1.2 Betriebsübergreifende Darstellung und Auswertung der GKZ-Einzelergebnisse

Zum direkten Vergleich der GKZ-Ergebnisse zwischen den verschiedenen Betrieben wurden einerseits die Keimzahlen als Boxplot dargestellt (Abbildung 4) und andererseits betriebsspezifische Unterschiede in der GKZ-Höhe statistisch (ANOVA, Bonferroni Folgetest) analysiert.

Der Median der GKZ-Ergebnisse der Rohmilch lag im Betrieb E am höchsten ($3.7 \log_{10}$ KBE/ml), im Betrieb G am tiefsten ($2.7 \log_{10}$ KBE/ml) und in der Sammelmilch bei $3.6 \log_{10}$ KBE/ml (Tabelle 2).

Tabelle 2: Median, 50%- und 80%-Bereiche der logarithmierten GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben

	80%-Bereich (\log_{10} -Stufen)	50%-Bereich (\log_{10} -Stufen)	Median (\log_{10} KBE/ml)
Betrieb A	0.50	0.23	3.32
Betrieb B	0.35	0.17	3.46
Betrieb C	0.86	0.27	3.20
Betrieb D	0.82	0.25	3.38
Betrieb E	0.87	0.48	3.66
Betrieb F	0.51	0.26	3.43
Betrieb G	1.08	0.70	2.69
Betrieb H	0.73	0.37	3.11
Betrieb I	1.28	0.55	3.33
Betrieb J	0.60	0.27	3.41
Betrieb K	0.50	0.23	3.48
Sammelmilch	0.86	0.31	3.57

Innerhalb der Betriebe schwankte der 80%-Bereich zwischen 0.4 (Betrieb B) und 1.3 \log_{10} -Stufen (Betrieb I) und der Quartilabstand (50%-Bereich) zwischen 0.2 (Betriebe A, B und K) und 0.7 \log_{10} -Stufen im Betrieb G.

Der 80%-Bereich der Sammelmilch lag bei 0.9 \log_{10} -Stufen und der Quartilabstand bei 0.3 \log_{10} -Stufen.

Unter Anwendung der ANOVA und des Bonferroni Folgetests erwiesen sich Unterschiede in den GKZ-Höhen zwischen den Betrieben als statistisch signifikant. Der Bonferroni Folgetest ergab, dass sich 30 der 66 Paarvergleiche signifikant unterschieden (45.5%) (Tabelle 3). Signifikant tiefere \log_{10} GKZ-Ergebnisse weist Betrieb G auf. Er unterscheidet sich in den Paarvergleichen mit allen Betrieben und der Sammelmilch signifikant. Auch die \log_{10} GKZ-Ergebnisse von Betrieb H liegen signifikant tief. Er unterscheidet sich mit den Betrieben B, D, E, F, G, I, J, K und der Sammelmilch. Ebenfalls in den meisten Paarvergleichen unterscheidet sich der Betrieb E. Ausser zu den Betrieben I und K und zur Sammelmilch liegen die \log_{10} GKZ-Ergebnisse der Proben von Betrieb E signifikant höher.

Mit dem Chi-Quadrat-Test liessen sich in der Untersuchungsperiode vor und in der Untersuchungsperiode nach der Alpung betriebsübergreifend keine signifikanten Unterschiede der GKZ feststellen ($p < 0.05$).

Tabelle 3: Tabelle zu den Bonferroni-Paarvergleichen der \log_{10} GKZ-Ergebnisse zwischen den Betrieben A bis K und der Sammelmilch S

Betriebe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	S
A	-	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	S
B	N	-	N	N	S	N	S	S	N	N	N	N
C	N	N	-	N	S	N	S	N	S	N	S	S
D	N	N	N	-	S	N	S	S	N	N	N	N
E	S	S	S	S	-	S	S	S	N	S	N	N
F	N	N	N	N	S	-	S	S	N	N	N	N
G	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S
H	N	S	N	S	S	S	S	-	S	S	S	S
I	N	N	S	N	N	N	S	S	-	N	N	N
J	N	N	N	N	S	N	S	S	N	-	N	S
K	N	N	S	N	N	N	S	S	N	N	-	N
S	S	N	S	N	N	N	S	S	N	S	N	-

N=nicht signifikant

S=signifikant

5.1.2 Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl (anaerobe GKZ)

5.1.2.1 Anaerobe GKZ-Einzelergebnisse geordnet nach Betrieben

Die anaeroben GKZ-Einzelergebnisse lagen zwischen $0.5 \log_{10}$ KBE/ml in Betrieb G und $4.1 \log_{10}$ KBE/ml in Betrieb E (Tabelle 4). Ebenfalls in Betrieb E lag der höchste Mittelwert, nämlich bei $3.2 \log_{10}$ KBE/ml. Der tiefste Mittelwert lag bei $1.9 \log_{10}$ KBE/ml (Betrieb G). Die Streuung innerhalb der jeweiligen Betriebe bewegte sich zwischen $1.2 \log_{10}$ -Stufen im Betrieb I und $2.5 \log_{10}$ -Stufen im Betrieb H.

Tabelle 4: Minimum, Maximum und Mittelwert der \log_{10} anaeroben GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilchprobe

		Minimum (\log_{10} KBE/ml)	Maximum (\log_{10} KBE/ml)	Mittelwert (\log_{10} KBE/ml)
Betrieb A	(n=38)	1.36	3.15	2.49
Betrieb B	(n=37)	1.60	3.32	2.60
Betrieb C	(n=35)	1.34	3.43	2.32
Betrieb D	(n=40)	1.95	3.30	2.65
Betrieb E	(n=36)	2.11	4.08	3.17
Betrieb F	(n=34)	1.34	3.20	2.5
Betrieb G	(n=34)	0.48	2.61	1.87
Betrieb H	(n=36)	1.40	3.92	2.39
Betrieb I	(n=38)	2.28	3.45	2.71
Betrieb J	(n=36)	1.00	3.08	2.41
Betrieb K	(n=35)	2.45	3.92	3.00
Sammelmilch	(n=36)	1.94	3.54	2.92

5.1.2.2 Betriebsübergreifende Darstellung und Auswertung der anaeroben GKZ-Einzelergebnisse

Analog der Auswertung der aeroben GKZ-Resultate wurden die Keimzahlen der anaeroben GKZ-Ergebnisse als Boxplot dargestellt (Abbildung 5) und statistisch (ANOVA, Bonferroni Folgetest) analysiert.

Der höchste Median lag bei 3.2 \log_{10} KBE/ml in Betrieb E. Betrieb G wies den tiefsten Median auf (1.9 \log_{10} KBE/ml) (Tabelle 5).

Der 80%-Bereich lag innerhalb der Betriebe zwischen 0.7 \log_{10} -Stufen (Betriebe J und K) und 1.3 \log_{10} Stufen in Betrieb G. Der Quartilabstand lag

bei 0.3 \log_{10} -Stufen in den Betrieben E und J und bei 0.6 \log_{10} -Stufen in den Betrieben F und G.

Der 80%-Bereich der Sammelmilch lag bei 0.8 \log_{10} -Stufen und der 50%-Bereich bei 0.3 \log_{10} -Stufen.

Tabelle 5: Median, 50%- und 80%-Bereiche der logarithmierten anaeroben GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben

	80%-Bereich (\log_{10} -Stufen)	50%-Bereich (\log_{10} -Stufen)	Median (\log_{10} KBE/ml)
Betrieb A	1.10	0.36	2.55
Betrieb B	0.95	0.49	2.59
Betrieb C	1.26	0.58	2.40
Betrieb D	0.86	0.50	2.70
Betrieb E	0.88	0.25	3.18
Betrieb F	1.10	0.55	2.57
Betrieb G	1.25	0.55	1.90
Betrieb H	0.93	0.5	2.39
Betrieb I	0.89	0.46	2.67
Betrieb J	0.74	0.28	2.48
Betrieb K	0.72	0.39	3.04
Sammelmilch	0.81	0.29	2.94

Mittels Anwendung der ANOVA ergaben sich signifikante Unterschiede in den anaeroben GKZ-Höhen zwischen den Betrieben. 35 der 66 Vergleiche (53%) unterscheiden sich im Bonferroni Folgetest signifikant (Tabelle 6). Signifikant tiefere anaerobe \log_{10} GKZ-Werte als alle anderen Betriebe und die Sammelmilch zeigte der Betrieb G. Signifikant höher liegen die anaeroben

\log_{10} GKZ-Ergebnisse von Betrieb E. Er unterscheidet sich in den Paarvergleichen zu allen Betrieben ausser zu Betrieb K und der Sammelmilch. Signifikant hoch liegen auch die anaeroben GKZ-Ergebnisse von Betrieb K und die der Sammelmilch. Betrieb K unterscheidet sich signifikant von Betrieb A, B, C, D, F, G, H und J. Die Sammelmilch zu Betrieb A, B, C, F, G, H und J.

Tabelle 6: Tabelle zu den Bonferroni-Paarvergleichen der anaeroben \log_{10} GKZ-Ergebnisse zwischen den Betrieben A bis K und der Sammelmilch S

Betriebe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	S
A	-	N	N	N	S	N	S	N	N	N	S	S
B	N	-	N	N	S	N	S	N	N	N	S	S
C	N	N	-	S	S	N	S	N	S	N	S	S
D	N	N	S	-	S	N	S	N	N	N	S	N
E	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	N	N
F	N	N	N	N	S	-	S	N	N	N	S	S
G	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S
H	N	N	N	N	S	N	S	-	S	N	S	S
I	N	N	S	N	S	N	S	S	-	N	N	N
J	N	N	N	N	S	N	S	N	N	-	S	S
K	S	S	S	S	N	S	S	S	N	S	-	N
S	S	S	S	N	N	S	S	S	N	S	N	-

N=nicht signifikant

S=signifikant

Betriebsübergreifend liessen sich keine signifikanten Unterschiede der anaeroben GKZ-Höhen vor und nach der Alpung nachweisen.

5.1.3 *Enterobacteriaceae*

5.1.3.1 *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse geordnet nach Betrieben

Die Nachweishäufigkeit von *Enterobacteriaceae* lag zwischen 8% im Betrieb B und 80% im Betrieb C. Die *Enterobacteriaceae*-Prävalenz in der Sammelmilch lag bei 84% (Tabelle 7).

Tabelle 7: *Enterobacteriaceae*-Prävalenz in den verschiedenen Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilch

	n	<i>Enterobacteriaceae</i> -positiv	
		n	%
Betrieb A	39	27	69.2
Betrieb B	36	8	22.2
Betrieb C	35	28	80.0
Betrieb D	42	30	71.4
Betrieb E	37	27	72.9
Betrieb F	34	11	32.4
Betrieb G	35	11	31.4
Betrieb H	36	16	44.4
Betrieb I	38	21	55.3
Betrieb J	36	14	38.9
Betrieb K	35	19	54.3
Betriebsübergreifend	403	212	52.6
Sammelmilch	37	31	83.8

Insgesamt lagen die logarithmierten *Enterobacteriaceae*-Keimzahlergebnisse der Rohmilchproben zwischen $0.5 \log_{10}$ KBE/ml im Betrieb B und $3.4 \log_{10}$ KBE/ml im Betrieb C. Die Sammelmilch erreichte einen Maximalwert von $2.4 \log_{10}$ KBE/ml.

Die Häufigkeitsverteilungen der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse von *Enterobacteriaceae*-positiven Proben sind aus den Abbildungen 6 bis 17 ersichtlich. Der überwiegende Anteil der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen lag in den Betrieben A, B, C, D, F, G, H, I, J und K zwischen 0 und $0.5 \log_{10}$ KBE/ml, während in Betrieb E der überwiegende Anteil im Bereich 1 bis $1.5 \log_{10}$ KBE/ml und bei der Sammelmilch bei 1.5 bis $2 \log_{10}$ KBE/ml lag.

Zumeist wurden geringe *Enterobacteriaceae*-Zahlen gefunden. Im Betrieb E und der Sammelmilch lagen die höchsten Werte in einem Bereich von 3.5 bis $4.0 \log_{10}$ KBE/ml. Werte $>3.5 \log_{10}$ KBE/ml wurden im Betrieb E und der Sammelmilch je nur in einer Probe gefunden und in den anderen Betrieben in keiner Probe.

Betrachtet man die Ergebnisse betriebsübergreifend, liessen sich vor und nach der Alpfung keine signifikanten Unterschiede in den *Enterobacteriaceae*-Keimzahl nachweisen.

5.1.4 *S.aureus*

5.1.4.1 *S.aureus*-Ergebnisse geordnet nach Betrieben

Die Nachweishäufigkeit von *S.aureus*-positiven Bestandesmilchproben lag zwischen 9% im Betrieb C und 100% im Betrieb K. In der Sammelmilch betrug die *S.aureus*-Prävalenz 95% (Tabelle 8).

Tabelle 8: *S.aureus*-Prävalenz in den verschiedenen Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilch

	n	<i>S.aureus</i> -positiv	
		n	%
Betrieb A	39	5	12.8
Betrieb B	36	6	16.7
Betrieb C	35	3	8.6
Betrieb D	42	19	45.2
Betrieb E	37	30	81.1
Betrieb F	34	9	26.5
Betrieb G	35	6	17.1
Betrieb H	36	33	91.7
Betrieb I	38	38	100
Betrieb J	36	15	41.7
Betrieb K	35	35	100
Betriebsübergreifend	403	200	49.6
Sammelmilch	37	35	94.6

Die logarithmierten *S.aureus*-Keimzahlen lagen zwischen 1.3 log₁₀ KBE/ml im Betrieb C und 3.9 log₁₀ KBE/ml im Betrieb I. In der Sammelmilch bei 3.1 log₁₀ KBE/ml.

Die Häufigkeitsverteilungen der *S.aureus*-Ergebnisse von *S.aureus*-positiven Proben sind in den Abbildungen 18 bis 29 dargestellt. Der überwiegende Anteil der *S.aureus*-Keimzahlen lag in den Betrieben A, B, C, D, E, F, und G zwischen 1 bis 1.5 log₁₀ KBE/ml, während in den Betrieben H, I und der Sammelmilch der überwiegende Anteil in Bereich 2 bis 2.5 log₁₀ KBE/ml lag.

Bei Betrieb J lag der überwiegende Anteil positiver Proben im Bereich 1.5 bis 2.5 \log_{10} KBE/ml und in Betrieb K zwischen 3.0 bis 3.5 \log_{10} KBE/ml.

Werte $>3.5 \log_{10}$ KBE/ml wurden einmal im Betrieb A, H und I gefunden, in Betrieb K in drei Proben. In den anderen Betrieben in keiner Probe.

Zwischen der ersten Untersuchungsperiode vor der Alpung und der zweiten Untersuchungsperiode danach liessen sich betriebsübergreifend Unterschiede in der Nachweishäufigkeit *S.aureus*-positiver Proben feststellen. So variierte dieser Anteil, ohne Berücksichtigung des jeweiligen Probenumfangs, zum Beispiel bei Betrieb J von 0% in der ersten Untersuchungshälfte und 100% in der zweiten Untersuchungsperiode (Tabelle 9).

Tabelle 9: *S.aureus*-Prävalenz in den Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K vor und nach der Alpung

	<i>S.aureus</i> -positiv %	
	vorher	nachher
Betrieb A	4.8	22.2
Betrieb B	0	40.0
Betrieb C	5.3	12.5
Betrieb D	18.2	75.0
Betrieb E	66.7	100
Betrieb F	0	52.9
Betrieb G	5.3	31.3
Betrieb H	90.5	93.3
Betrieb I	100	100
Betrieb J	0	100
Betrieb K	100	100
Betriebsübergreifend	35.7	66.5
Sammelmilch	90.5	22.2

Mit dem Chi-Quadrat-Test liessen sich vor und nach der Alpung signifikante Unterschiede in der Nachweishäufigkeit *S.aureus*-positiver Proben feststellen ($p < 0.05$).

So haben die Betriebe B, D, E, F und J eine signifikant höhere Zahl positiver Proben.

5.1.5 Gegenüberstellung der GKZ-Ergebnisse und des Anteils *Enterobacteriaceae*-positiver Proben

Beim Vergleich des Medians der GKZ-Ergebnisse mit der *Enterobacteriaceae*-Prävalenz liess sich bei höherem GKZ-Median nicht unbedingt eine eher höhere *Enterobacteriaceae*-Prävalenz nachweisen. Insgesamt zeigte sich keine eindeutige Tendenz (Tabelle 10).

So zeigte sich z.B. in Betrieb B im Vergleich zu den anderen Betrieben die niedrigste *Enterobacteriaceae*-Prävalenz (22.2%) bei durchschnittlichem GKZ-Median ($3.46 \log_{10}$ KBE/ml). Im Vergleich dazu zeigten Proben aus dem Betrieb C mit vergleichbarem GKZ-Median ($3.20 \log_{10}$ KBE/ml) eine *Enterobacteriaceae*-Prävalenz von 80.0%.

Statistisch erwies sich die Beziehung zwischen der GKZ-Höhe und dem qualitativen *Enterobacteriaceae*-Nachweis in den Betrieben und der Sammelmilch als nicht signifikant.

Tabelle 10: GKZ-Median und *Enterobacteriaceae*-Prävalenz geordnet nach Betrieben

	Median GKZ (log ₁₀ KBE/ml)	<i>Enterobacteriaceae</i> - Prävalenz
Betrieb A	3.32	69.2%
Betrieb B	3.46	22.2%
Betrieb C	3.20	80.0%
Betrieb D	3.38	71.4%
Betrieb E	3.66	72.9%
Betrieb F	3.43	32.4%
Betrieb G	2.69	31.4%
Betrieb H	3.11	44.4%
Betrieb I	3.33	55.3%
Betrieb J	3.41	38.9%
Betrieb K	3.48	54.3%
Sammelmilch	3.57	83.8%

Die graphische, nach Betrieben geordnete Gegenüberstellung der GKZ-Mediane und der Anzahl *Enterobacteriaceae*-positiver Proben ist aus Abbildung 30 ersichtlich. Auffallend war dabei der im Vergleich zu den GKZ-Medianen unerwartet häufige *Enterobacteriaceae*-Nachweis in Bestandesmilchproben aus Betrieb C und demgegenüber zeigt sich bei Betrieb B, dass bei einem durchschnittlichen GKZ-Median eher weniger *Enterobacteriaceae*-positive Resultate nachweisbar waren.

5.1.6 Gegenüberstellung der GKZ-Ergebnisse und des Anteils *S.aureus*-positiver Proben

Der Vergleich der Mediane der GKZ-Ergebnisse mit der *S.aureus*-Prävalenz zeigte, dass sich häufig bei einem tiefen GKZ-Median auch eine eher tiefere *S.aureus*-Prävalenz bzw. bei höherem GKZ-Median eine eher höhere *S.aureus*-Prävalenz feststellen liess (Tabelle 11).

Auffallend aber war die eher hohe *S.aureus*-Prävalenz (91.7%) von Betrieb H mit einem im Vergleich zu den anderen Betrieben tiefen GKZ-Median (3.0 log₁₀ KBE/ml). Weniger häufig waren *S.aureus*-positive Proben in Betrieb B (16.7%) und F (26.5%) bei einem durchschnittlichen GKZ-Median von 3.5 bzw. 3.4 log₁₀ KBE/ml.

Tabelle 11: GKZ-Median und *S.aureus*-Prävalenz geordnet nach Betrieben

	Median GKZ (log ₁₀ KBE/ml)	<i>S.aureus</i> - Prävalenz
Betrieb A	3.32	12.8%
Betrieb B	3.46	16.7%
Betrieb C	3.20	8.6%
Betrieb D	3.38	45.2%
Betrieb E	3.66	81.1%
Betrieb F	3.43	26.5%
Betrieb G	2.69	17.1%
Betrieb H	3.11	91.7%
Betrieb I	3.33	100%
Betrieb J	3.41	41.7%
Betrieb K	3.48	100%
Sammelmilch	3.57	94.6%

Statistisch liess sich in der Beziehung zwischen der GKZ-Höhe und dem qualitativen *S.aureus*-Nachweis in den Betrieben keine signifikanten Unterschiede feststellen.

In Abbildung 31 graphisch dargestellt ist die nach Betrieben geordnete Gegenüberstellung der GKZ-Mediane und der *S.aureus*-Prävalenzen. Daraus ersichtlich ist die auffallend hohe *S.aureus*-Prävalenz von Betrieb H bei im Vergleich zu den anderen Betrieben niedrigerem GKZ-Median.

5.2 Quantitative mikrobiologische Untersuchungen der Käse

5.2.1 Verlaufskurve der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl

Die logarithmierten GKZ-Ergebnisse der untersuchten Sammelmilchproben und der daraus hergestellten Käsechargen sind in Abbildung 32 als Verlaufskurve dargestellt. Der anfängliche GKZ-Median von $3.6 \log_{10}$ KBE/ml Sammelmilch steigt bis zur Bruchbildung auf einen GKZ-Median von $8.2 \log_{10}$ KBE/g an und bleibt während der ganzen Beprobungsdauer von 91 Tagen relativ konstant und hoch. Die letzten Käseproben mit einer Reifedauer von 91 Tagen wiesen einen GKZ-Median von $7.8 \log_{10}$ KBE/g auf.

5.2.2 Milchsäurebildner

Die logarithmierten Keimzahlergebnisse der Milchsäurebildner der beprobten Käsechargen sind in Abbildung 33 als Verlaufskurve aufgezeichnet. Der Median der Bruchproben der Milchsäurebildner zum Tag 0 beträgt $8.1 \log_{10}$ KBE/g und bleibt relativ hoch bis zu Tag 91, an dem der Median $7.7 \log_{10}$ KBE/g beträgt.

5.2.3 *Enterobacteriaceae*

Der Median der Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* der verschiedenen untersuchten Sammelmilchen beträgt vor Beginn der Milchverarbeitung $1.5 \log_{10}$ KBE/ml Rohmilch. Dieser Wert steigt bis zur Bruchbildung nach ca. 3 Stunden auf einen Median von $3.2 \log_{10}$ KBE/g Käseprobe an und steigt bis zur nächsten Probenentnahme nach einer Woche weiter an auf $3.6 \log_{10}$ KBE/g, fällt nach 5 Wochen wieder auf $3.2 \log_{10}$ KBE/g (Abbildung 34).

5.2.4 *S.aureus*

Die *S.aureus*-Keimzahl steigt während den ersten Stunden der Herstellung von durchschnittlich 1×10^2 KBE/ml in der Rohmilch bis zu einer Höhe von durchschnittlich knapp 1×10^4 KBE/g im Käsebruch an und bleibt während der ersten Reifewoche praktisch konstant. In der zweiten Woche beginnt die Keimzahl von *S.aureus* stetig zu fallen und ist ab einer Reifedauer von 63 Tagen bis auf wenige Ausnahmen in den Käseproben nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 35).

Weitergehende Untersuchungen zu *S.aureus*

Enterotoxingene wurden in 40 Isolaten (n=51) nachgewiesen. Alle Isolate wurden nach 7 Tage Reifedauer gesammelt und stammen von 22 verschiedenen Käsechargen. Alle Isolate waren *sea*-positiv. In keinem der Isolate konnte *seb*, *sec*, *sed* oder *see* nachgewiesen werden.

Durch die Genotypisierung konnten insgesamt vier unterschiedliche *S.aureus*-Genotypen gefunden werden (Abbildung 36a und 36b). Im überwiegenden Anteil der Isolate konnte ein dominierender Typ I festgestellt werden. In Betrieb H, K und der Sammelmilch konnte ausschliesslich dieser Typ I gefunden werden. In Betrieb I liess sich neben Typ I auch ein Typ II und ein Typ III finden. Dagegen liess sich bei Betrieb E nur Typ II nachweisen.

Auch in den Käseproben der vier Chargen konnte mit wenigen Ausnahmen Typ I nachgewiesen werden. In drei Chargen war auch Typ II und in zwei Chargen Typ III nachweisbar. Im Salzbad konnte neben Typ I ein Typ IV

festgestellt werden, der sich auch in einer Käsecharge finden liess (Tabelle 12).

Tabelle 12: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der *S.aureus*-Isolate aus Bestandesmilchproben in den Betrieben E, H, I und K, der Sammelmilch, des Salzbadess und der Käse-Stufenkontrollen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 63 (K_0 bis K_{63}) der ausgewählten Produktionswochen 5, 8, 15 und 20

	Produktionswoche 5	Produktionswoche 8	Produktionswoche 15	Produktionswoche 20
	Genotyp (n)	Genotyp (n)	Genotyp (n)	Genotyp (n)
Betrieb E	II (2)	II (1)	-	II (1)
Betrieb H	I (2)	I (2)	-	I (1)
Betrieb I	II (2)	I (2)	I (1)	I (1), III (1)
Betrieb K	I (2)	I (2)	I (2)	I (1)
Sammelmilch	I (2)	I (2)	I (2)	I (1)
Salzbad	-	-	I (2)	I (1), IV (1)
K_0	I (2)	I (3)	I (2)	I (2)
K_7	I (2)	I (2)	I (2)	I (2), IV (1)
K_{14}	I (1)	I (3)	I (4)	I (2)
K_{21}	I (1)	I (1)	I (2), III (1)	I (2), IV (1)
K_{28}	I (2)	I (1)	I (1)	I (1), IV (1)
K_{35}	II (1)	I (1)	I (2)	-
K_{63}	I (1)	-	-	-

5.3 Qualitative mikrobiologische Untersuchungen von Rohmilch und Rohmilchkäse

5.3.1 Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC)

Von den 283 mittels PCR-Screening auf *stx*-Gene untersuchten Betriebsmilchproben waren 7 Proben (8.5%) *stx*-positiv. Je zwei positive Proben liessen sich in den Betrieben E und K nachweisen, je eine in den Betrieben A, B und G.

Von den insgesamt 52 Sammelmilchproben während des Zeitraums der Alpengänge waren 2 Proben *stx*-positiv (3.8%). Eine dieser Sammelmilchprobe stammte vom Betrieb D, die andere ist eine Sammelmilchprobe der Betriebe A, E und I.

In 5 der 46 Käsechargen konnte STEC nachgewiesen werden (10.7%). Es konnte aber in den jeweiligen Käsechargen nur zu einzelnen Untersuchungstagen und nicht über die gesamte Reifedauer *Stx*-positive Proben gefunden werden. In einer Käsecharge konnte einzig die Bruchprobe *Stx*-positiv getestet werden. Eine Käsecharge wurde mit einer Reifedauer von 14 Tagen positiv getestet, zwei Käsechargen mit 28 Tagen, eine Charge mit 91 Tagen Reifedauer und eine Charge wurde mit 14 und wieder mit 63 Tagen Reifedauer *Stx*-positiv getestet.

Die Charakterisierung der Toxinvarianten der insgesamt 5 von Rohmilch- und Käseproben isolierten STEC-Stämme ergab, dass bei einem Isolat das *Stx1*-Gen, bei 3 Isolaten das *Stx2*-Gen und einem Isolate das *Stx1*- und das *Stx2*-Gen nachweisbar war. Keine der isolierten Probe war *eae*-positiv und nur eines der *Stx2*-positiven Isolate war zudem *hly*-positiv. Alle Stämme waren zudem *ehx*-positiv. Alle Stämme gehörten zur Gruppe der non O157 *E.coli* (Tabelle 13).

Tabelle 13: Charakterisierungsergebnisse der 5 isolierten STEC-Stämme

Serotyp	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hly</i>
O2:H45	+	-	-	-
ONT:H ⁻	-	+	-	-
O116:H21	-	+	-	+
ONT:H12	+	+	-	-
O2:H27	-	+	-	-

5.3.2 Listerien

In den insgesamt 283 Betriebsmilchproben und den 52 Sammelmilchproben während der Alpung liessen sich in keiner Probe Listerien nachweisen.

Ebenfalls konnte in keiner der untersuchten Käseteig-Proben der 46 verschiedenen Chargen Listerien nachgewiesen werden.

5.4 Ausgewählte Parameter im Käse

5.4.1 Ergebnisse der a_w -Wert-Bestimmung im Käse

Der durchschnittliche a_w -Wert in den 4 untersuchten Käsechargen (Teigmateriel) beträgt am Tag 0 (Bruchmaterial) 0.99, fällt während den ersten beiden Reifungswochen auf 0.97 und bleibt auf diesem Niveau bis zum 35.Tag. Am 63.Reifungstag weisen alle untersuchten Käselaibe der 4 verschiedenen Chargen einen a_w -Wert von 0.96 auf, der bis zum 91.Tag konstant bleibt.

5.4.2 Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung im Käse

Der Verlauf des pH-Wertes im Käse während der Reifung ist in Tabelle 14 aufgeführt. Im Bruchmaterial des Käses konnte ein durchschnittlicher pH-Wert von 6.4 gemessen werden, der während den ersten Tagen auf 5.7 abfällt. Im Laufe der Reifung beginnt der pH wieder anzusteigen, bis er am Tag 91 einen Wert von 6.5 erreicht.

Tabelle 14: Durchschnittliche pH-Messwerte der ausgewählten Käsechargen an den Untersuchungstagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 63 und 91

Tag	0	7	14	21	28	35	63	91
pH-Wert	6.43	5.70	5.60	5.76	6.0	5.93	6.20	6.50

6 Diskussion

6.1 Quantitative Parameter

6.1.1 Rohmilch

Die aerobe und anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie die Zahl der *Enterobacteriaceae* dienen als Qualitäts- und Hygieneparameter.

Mit durchschnittlichen Gesamtkeimzahlwerten von 10^3 KBE/ml war die mikrobiologische Qualität der Rohmilchproben der meisten Betriebe als sehr gut zu beurteilen. Diese Untersuchungsergebnisse sind vergleichbar mit einer Studie von *Stephan et al.* (2002), bei der Bestandesmilchproben aus der Nordostschweiz untersucht wurden.

Der Anteil der Proben mit Nachweis von *Enterobacteriaceae* (52,6%) liegt zwar deutlich über jener Studie von *Stephan et al.* (7,1%), doch weisen die positiven Proben tiefe Keimzahlen auf.

Der Grund dieser guten Resultate liegt u.a. sicherlich in den Anstrengungen des MIBD während der letzten Jahre und der Kopplung der GKZ-Höhe an den Milchpreis.

Die Prävalenz von *S.aureus* in den Bestandesmilchproben mit einem Anteil von 50% ist hoch. Ähnliche Daten liefern weitere Studien aus der Schweiz: in der oben erwähnten Arbeit von *Stephan et al.* (2002) wurde eine *S.aureus*-Prävalenz in Bestandesmilchproben von 62% festgestellt. In einer früheren Studie von *Schällibaum et al.* (1978) wurde eine Prävalenz von 60% nachgewiesen. Bei einer Untersuchung von Rohmilchproben in Italien wurde von *Moretti et al.* (1998) von einer *S.aureus*-Prävalenz von 34.3% berichtet.

Die Prävalenz *S.aureus*-positiver Sammelmilchproben aus der Käserei ist in dieser Arbeit noch deutlich höher und liegt bei 94.6%. In der Literatur liegen nur wenige Vergleichsarbeiten vor. In einer Studie aus der Schweiz wird in Sammelmilchproben von milchverarbeitenden Betrieben eine hohe Prävalenz von sogar 100% nachgewiesen (Bachmann et al., 1995). Eine Studie aus Brasilien beschreibt in Sammelmilchproben aus milchverarbeitenden Betrieben eine *S.aureus*-Prävalenz von 90.4% (Tondo et al., 2000).

6.1.2 Käse

Der halbharte Bio-Gomserkäse hat sich deshalb so gut für diese Untersuchungen geeignet, da sowohl die zur Herstellung verwendete Rohmilch als auch die folgende Herstellung und Reifung der jeweiligen Käsecharge beobachtet und beprobt werden konnte. Für die Schweiz gibt es bis anhin wenig Informationen über die Verbreitung und das Verhalten von pathogenen Bakterien in „Risiko-Lebensmittel“. Für die Gefahreinschätzung sind aber solche Informationen aus lebensmittelhygienischer Sicht zwingend notwendig.

Die Verlaufswerte von pH- und a_w -Werten entsprachen den Erwartungen für ein solches Produkt. Der pH-Wert fällt anfangs der Käsereifung infolge der Milchsäurebildung ab und beginnt danach wegen der Bildung von proteolytischen Produkten wieder langsam anzusteigen. Die genaue Verlaufskurve hängt natürlich von der jeweiligen Käsesorte, deren Herstellungsprozess und insbesondere der Säuerungskulturen ab (Eckner et al., 1991). Der a_w -Wert fällt im Bio-Gomser von 0.99 zu Beginn auf 0.96 am Ende der Reifedauer.

Die Verlaufskurven der Gesamtkeimzahl und der Milchsäurebildner stimmen in der Höhe der Keimzahl und im Verlauf praktisch überein und zeigen, dass die GKZ überwiegend aus Milchsäurebildner besteht.

Die Daten sowohl der Gesamtkeimzahl und der Milchsäurebildner, als auch der *Enterobacteriaceae* und *S.aureus* zeigen einen Anstieg ihrer Keimzahl während der Herstellung des Käses. Dies stimmt mit Verläufen in anderen Käsesorten in früheren publizierten Daten überein (Park et al., 1970; Eckner et al., 1991; Bachmann et al., 1995). Betrachtet man aber das Verhalten der Bakterien während der Reifedauer, zeigen sich Unterschiede. Im Gegensatz zum langen Überleben der Milchsäurebildner auf konstantem Niveau (1×10^8 KBE/g) fällt die anfänglich relativ hohe Keimzahl der *Enterobacteriaceae* und der *S.aureus* während der Reifung deutlich ab.

Die als Starterkultur benutzten Milchsäurebakterien geniessen im Milieu des Käses einen Standortvorteil, womit sich ihr langes und konstantes Überleben

erklären dürfte. Der hohe Anstieg der GKZ im Käsebruch ist mit der Zugabe der Starterkultur zu Beginn der Käsefabrikation zu erklären.

S.aureus steigt während den ersten Stunden der Herstellung von durchschnittlich 1×10^2 KBE/ml in der Rohmilch bis zu einer Keimzahl von durchschnittlich knapp 1×10^4 KBE/g im Bruch an. Dass sich *S.aureus* während der Käseherstellung vermehren kann, wurde schon mehrmals in Arbeiten nachgewiesen (Tuckey et al., 1964; Zehren et al., 1968; Tatini et al., 1971; Tatini et al., 1973; Eckner et al., 1991; Bachmann et al., 1995).

Neben *S.aureus* steigt auch die Keimzahl der *Enterobacteriaceae* zu Beginn des Herstellungsprozesses deutlich an.

S.aureus und *Enterobacteriaceae* scheinen gut fähig zu sein, den frühen Herstellungsprozess zu überleben, vermehren sich sogar während der Erwärmung der Kesselmilch. Einen weiteren wichtigen Einfluss könnte der relativ hohe pH-Wert von 6.4 im Bruch haben. Die hohen Keimzahlen bleiben während der ersten Reifungswoche stabil und fallen erst dann langsam ab. Ähnliche Ergebnisse für *S.aureus* wurde bereits von *Eckner et al.* (1991) und *Bachmann et al.* (1995) beschrieben. Allerdings dürfen solche Vergleiche nur mit Vorsicht genossen werden, da unterschiedliche Käse mit unterschiedlichen Fabrikationsparametern untersucht wurden.

Die oft beschriebene rasche Produktion von Säure als wichtigster Faktor bei der Elimination von pathogenen Bakterien scheint während der ersten Woche der Käsereifung noch keinen bzw. geringen Einfluss auf das Verhalten von *S.aureus* oder der *Enterobacteriaceae* zu haben. Es scheint keinen konkreten Parameter zu geben, der das Wachstum der *Enterobacteriaceae* und *S.aureus* verhindert. Auch die 24-Stündige Lagerung des Käselais im Salzbad verhindert die Vermehrung nicht. Die hohe Salztoleranz von Staphylokokken wurde schon in einigen Studien bewertet (Koenig et al., 1982; Ahmed, 1983; Furtado, 1985).

Erst ab der zweiten Woche beginnt die Keimzahl dieser beiden untersuchten Parameter abzunehmen, sie überleben aber beachtlich lange Zeit im Halbhartkäse. Ähnliche Ergebnisse wurde auch in einer Studie von *Gomez-Lucia et al.* (1992) festgestellt.

Nach 90 Tagen Reifedauer konnte *S.aureus* nur noch in zwei Proben in geringer Menge gefunden werden, *Enterobacteriaceae* dagegen sogar noch in elf Proben. In einer vergleichbaren Arbeit von *Bachmann et al.* (1995) wurde ebenfalls das lange Überleben von *S.aureus* beschrieben, nach 90 Tagen Reifung waren in jener Arbeit keine *S.aureus*-Keime mehr nachweisbar.

Für den Abfall der Keimzahlen dürfte ab der zweiten Woche der tiefe pH-Wert im Käse einen Einfluss haben. Er beginnt erst in der vierten Woche wieder anzusteigen. Später kommt auch der abfallende a_w -Wert hinzu und die antagonistische Starterkultur-Flora und dadurch der antimikrobielle Effekt der Milchsäure. Bei der Milchsäurebildung selbst dürften inhibitorische Faktoren entstehen, die das Wachstum von pathogenen Bakterien hemmen (Bachmann et al., 1995). Der konservative Effekt von Milchsäurebildnern kann wohl einerseits auf das Laktoperoxidase-System und andererseits auf bakteriostatische Substanzen zurückzuführen sein (Asperger, 1986).

Dass die kompetitive Flora einen Einfluss auf das Wachstum von *S.aureus* haben kann, wies u.a. schon *Genigeorgis* (1989) in der Rohmilch nach.

6.1.2.1 Enterotoxinbildung im Käse

Da bei einem Reifungszeitpunkt von 7 Tagen die höchsten Keimzahlen von *S.aureus* erreicht wurden, waren gerade die in diesem Zeitpunkt isolierten Stämme von besonderem Interesse.

Da zur genügenden Toxinbildung Keimzahlen von min. 10^5 KBE/g nötig sind, wurden verschiedene Kolonien von unterschiedlichen Käsechargen nach einer Reifedauer von 7 Tagen gesammelt. Wie oben erwähnt, sind alle untersuchten Stämme *sea*-positiv. Im Verlauf dieser Arbeit konnte zu keinem Zeitpunkt der Käsereifung eine Keimzahl von 10^5 KBE/g oder darüber nachgewiesen werden. Trotzdem sind in einigen wenigen Käseproben mit einer Reifedauer von 7 und 14 Tagen sehr hohe Keimzahlen festgestellt worden. Bei einer höheren *S.aureus*-Ausgangskeimzahl in der Rohmilch muss aber davon ausgegangen werden, dass Keimzahlen von 10^5 KBE/g oder mehr erreicht werden können und damit auch Enterotoxine im Käse

gefunden werden können. Da die *S.aureus*-Belastung in der Rohmilch hauptsächlich auf Mastitiden, v.a. die subklinische Form, zurückzuführen ist, ist ein gutes Mastitis-Management von grosser Wichtigkeit.

Probleme im Mastitis-Management erklären auch die deutlich höhere Prävalenz von *S.aureus*-positiven Rohmilchproben nach der Alpung.

Die Angaben über den Anteil Enterotoxin-bildender *S.aureus* isoliert aus Rohmilch variieren in der Literatur von 5 - 74%. Vor allem SEC- und SED-Bildner wurden aus der Milch isoliert (Takeshige et al., 1983; Becker et al., 1989; Jermini et al., 1990; Gilmour et al., 1990; Ombui et al., 1992; Müller et al., 1996). In Milchprodukten werden alle Enterotoxine A - E nachgewiesen, wobei das Enterotoxin A dominiert (Payne et al., 1974). In einer Studie aus der Schweiz (Jermini et al, 1990) wurden 59 Rohmilchfrischkäse aus kleinen Produktionsbetrieben auf *S.aureus* untersucht. 42 isolierte Stämme wurden mittels ELISA auf Enterotoxinbildung untersucht. Von diesen Stämmen bildeten 28 mindestens ein Toxin. Von 24 Stämmen und somit am häufigsten wurde SED gebildet.

6.1.2.2 Genotypen der *S.aureus*-Isolate aus Milch und Käse

Der überwiegend vorkommende Genotyp I lässt sich in mehreren verschiedenen Betrieben nachweisen und dominiert auch in der Sammelmilch und den daraus hergestellten Käsechargen (Abbildung 36a und 36b). Vereinzelt wurde Genotyp II und III in Betriebsmilchen gefunden. Diese Genotypen haben sich aber im Käse nicht durchgesetzt. Dagegen konnte der im Salzbad festgestellte Genotyp IV in Woche 20 auch im Käse der gleichen Produktionswoche mehrfach während der Reifung gefunden werden.

6.2 Qualitative Parameter

6.2.1 STEC in Milch

Die Prävalenzdaten bezüglich STEC in Rohmilch schwanken je nach Land und Autor zwischen 0.0% und 6.4%. In den eigenen Untersuchungen wurden

Stx-positive Proben mittels PCR mit einer Prävalenz von 2.5% (7 Proben) bei den Betriebsmilchproben und einer Prävalenz von 5.7% (3 Proben) bei den Alp-Sammelmilchproben gefunden. In keiner der 37 Sammelmilchproben aus der Käserei konnten STEC-positive Proben gefunden werden. Vergleichbar mit den eigenen Ergebnissen der Bestandesmilchproben sind Studien aus der Schweiz, Deutschland und Irland. So wies *Stephan et al.* 1999 eine STEC-Prävalenz in Colimastits-Milch von 2.8% nach. In Deutschland lag die Prävalenz Stx-positiver Proben in den Arbeiten von *Montag* (1994) und *Klie et al.* (1997) auf vergleichbarem Niveau (2.6% resp. 2.1%). Eine Stx-positive Prävalenz von 2.1% wies eine Studie aus Irland von *McKee* (2003) nach.

In Bezug auf die Herkunftsbetriebe liessen sich in 5 der 11 Betriebe Stx-positive Proben finden: jeweils einmal waren die Bestandesmilchproben von den Betrieben A, B, G und zweimal in den Betrieben E und K Stx-positiv.

Zwei der Stx-positiven Alp-Sammelmilchproben stammen von einem Alpbetrieb, der von den Betrieben C, D und G betrieben wird und eine positive Sammelmilchprobe von einem Alpbetrieb, der von den Betrieben A, E und I bewirtschaftet wird. In der Sammelmilch der zwei übrigen Alpbetriebe konnte keine Stx-positive Probe gefunden werden.

6.2.2 STEC in Käse

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte in 5 der 46 Käsechargen STEC nachgewiesen werden (10.7%). Es konnte aber in den jeweiligen Käsechargen nur zu einzelnen Untersuchungstagen und nicht über die gesamte Reifedauer Stx-positive Proben gefunden werden. In einer Käsecharge konnte einzig die Bruchprobe (Tag 0) Stx-positiv getestet werden. Eine Käsecharge wurden mit einer Reifedauer von 14 Tagen positiv getestet, zwei Käsechargen mit 28 Tagen, eine Charge mit 91 Tagen Reifedauer und eine Charge wurde mit 14 und wieder mit 63 Tagen Reifedauer Stx-positiv getestet. Obwohl für diesen Untersuch jeweils nur ein einziger Käselaib pro Charge beprobt wurde, konnte STEC zum Teil erst nach einigen Wochen Reifedauer nachgewiesen werden. Dies dürfte sich mit der inhomogenen Verteilung der Keime erklären lassen.

Zur Untersuchung der STEC-Prävalenz in Rohmilchkäse lässt sich relativ wenig Literatur finden.

So war 1 von 221 untersuchten Proben aus Rohmilchweichkäse in einer spanischen Studie von *Quinto et al.* (1997) Stx-positiv. Hingegen waren 60 von 603 (10%) Käseproben aus Frankreich positiv auf Stx getestet worden (Pradel et al., 2000). Im Jahre 2002 konnte in Argentinien in einer Arbeit von *Gomez et al.* eine STEC-Prävalenz in Weichkäse von 0.9% festgestellt werden.

Isolierung und Identifizierung von Shigatoxin-bildenden *E.coli* (STEC)

Neben der Produktion eines oder mehrerer Shigatoxine der Typen Stx1 und Stx2 mit jeweils diversen Subtypen, sind für STEC eine ganze Reihe weiterer Virulenz-assoziiertes und möglicherweise Pathogenitäts-steigender Faktoren, wie zum Beispiel das Intimin (*eae*), das Enterohämolysin (EHEC-*hlyA*) oder das hitzestabile Enterotoxin (*astA*) bekannt (Law, 2000).

Von aus Patienten isolierte O157 und non-O157-Stämme zeigen häufig ein typisches Virulenzspektrum. Solche Stämme sind in der Regel Stx2- und *eae*-positiv (Thomas et al., 1993; Caprioli et al., 1995; Piérard et al., 1997; Boerlin et al., 1999).

Die Charakterisierung von Rohmilch- und Käseproben isolierten STEC-Stämme ergab, dass bei einem Isolat das Stx1-Gen, bei 3 Isolaten das Stx2-Gen und einem Isolate das Stx1- und das Stx2-Gen nachweisbar war. Keine der isolierten Probe war *eae*-positiv und nur eines der Stx2-positiven Isolate war zudem *hly*-positiv.

Shigatoxin-bildende *E.coli* kommen zwar mit einer relativ tiefen Prävalenz in Rohmilch und Rohmilchkäse vor. Unter den genotypisch weitergehend charakterisierten Stämmen fanden sich keine mit Virulenzfaktoren, die grundsätzlich als humanpathogen einzustufen sind. Doch lassen sich in der eigenen Studie selbst nach einer Reifedauer von 90 Tagen STEC-Stämme im Käse nachweisen. Dies bestätigen auch Inokulationsversuche mit *E.coli*

O157:H7. Die Studie von *Maher et al.* (2001), weist diesen Stamm auch im 90 Tage alten Rohmilchkäse nach. In weiteren Studien wurde das Überleben von *E.coli* O157:H7 während der Herstellung und Reifung untersucht. *Arocha et al.* (1992) wies nach, dass die *E.coli*-Keimzahl in cottage cheese während der Herstellung ansteigt, aber bei der Erhitzung des Bruches auf 57 °C während 90 min. abgetötet werden. *Reitsma et al.* (1996) stellte fest, dass im Cheddar-Käse die *E.coli* O157:H7-Keimzahl während einer Reifungsdauer von 60 Tagen nur um 2 log-Einheiten abnimmt und *Ramsaram et al.* (1998), dass dieser pathogene Keim die Herstellung von Camembert und Feta-Käse überlebt und nach 75 bzw. 65 Reifetagen höhere Keimzahlen erreicht, als in der Milch.

Im Rahmen eines Sicherheitskonzeptes bei der Herstellung von Rohmilchkäse ist deshalb die Einhaltung einer strikten Hygiene bei der Milchgewinnung und -verarbeitung von zentraler Bedeutung.

6.2.3 Listerien in Milch

Über das Vorkommen von Listerien in der Milch gibt es eine grosse Anzahl von Untersuchungen. *L.monocytogenes* kann einerseits eine Euterentzündung verursachen und dadurch in die Rohmilch gelangen, was allerdings äusserst selten der Fall ist (De Vries et al., 1956; Stajner, 1971; Jensen et al. 1973; Gitter et al., 1980). Nach wie vor steht aber das Hygieneproblem als primäre Ursache für das Vorhandensein von *L.monocytogenes* in Rohmilch an erster Stelle. Nach *Sanaa et al.* (1993) sind dafür vor allem Silage von schlechter Qualität (pH>4), mangelnde Hygiene in Räumen und bei der Tierhaltung und unzureichende Reinigung und Desinfektion der Melkanlagen verantwortlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weder in den 238 Betriebsmilchproben, den 37 Sammelmilchproben aus der Käserei noch den 52 Sammelmilchproben während der Alpung *Listeria* spp. isoliert werden. In einer anderen schweizer Studie aus dem Jahre 2002 von *Stephan et al.* konnten aus 310 Bestandesmilchproben aus 205 Milchviehbetrieben der Nordostschweiz ebenfalls keine Listerien nachgewiesen werden.

In den meisten Arbeiten wurden Prävalenzwerte von *L.monocytogenes* in Rohmilchproben von 0% bis 16% festgestellt.

In Europa lagen die Prävalenzen in untersuchten Bestandesmilchproben und Rohmilchproben zwischen 0.0% in Italien und der Schweiz (Massa et al., 1990; Stephan et al., 2002) und 45.3% in Spanien (Dominguez Rodriguez et al., 1985).

In amerikanischen Arbeiten wurden Prävalenzen zwischen 4.1% in Bestandesmilchproben bis 12.6% in Milchfilterproben nachgewiesen (Fleming et al., 1985; Hayes et al., 1985; Lovett et al., 1987; Rohrbach et al., 1992; Hassan et al., 2000). In Kanada lag die Prävalenz der *L.monocytogenes* positiven Bestandesmilchproben zwischen 1.3% und 4.1% (Farber et al., 1988; Slade et al., 1989; Steele et al., 1997). Und in Südamerika wurden in vier verschiedenen Arbeiten in Rohmilchproben Prävalenzen von 0.0% bis 9.5% festgestellt (Moura et al., 1993; Adesiyun et al., 1996; Padilha et al., 2001; Reuben et al., 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeit von *Stephan et al.* (2002) zeigen, dass Rohmilch in der Schweiz für Lebensmittelinfektionen durch Listerien eine untergeordnete Rolle spielt.

6.2.4 Listerien im Käse

In der Schweiz werden annähernd 50% der produzierten Milch für die Käseherstellung verwendet, 80% davon werden aus Rohmilch ohne vorhergehende Hitzebehandlung hergestellt (Bachmann et al., 1995). Generell stellen Weichkäse ein grösseres Risiko für die Übertragung von Listerien dar (Zottola et al., 1991) als Halbhart- oder Hartkäse. *L.monocytogenes* kann aber durchaus in anderen Käsesorten überleben. Wie von *Bachmann et al.* (1995) bewiesen, wurde *L.monocytogenes* im Inneren von Halbhartkäse noch nach über 90 Tagen Reifedauer nachgewiesen.

Von den 46 untersuchten Käsechargen wurden zu keinem Zeitpunkt der Reifung *Listeria* spp. nachgewiesen.

Im Gegensatz zu Untersuchungen in der Milch gibt es nur eine geringe Anzahl an Untersuchungen über das Vorkommen von Listerien in Käse.

So wurden 1989 von *Rodler et al.* 100 Käseproben in Ungarn untersucht, wovon 2 Proben *L.monocytogenes*-positiv waren. 1990 wies *Massa et al.* in Italien eine *L.monocytogenes*-Prävalenz von 1.6% in Weichkäseproben nach. In Schweden wurde 1995 in 6% der Käseproben aus dem Einzelhandel *L.monocytogenes* festgestellt. Käse aus Rohmilch waren häufiger mit *L.monocytogenes* kontaminiert (42%) als Käse aus hitzebehandelter Milch (2%) (Loncarevic et al., 1995).

In einer weiteren Studie von *Rudol et al.* (2001) wurde europäischer Rotschmierekäse aus verschiedenen Ländern Europas untersucht. Insgesamt waren 6.4% der Proben *L.monocytogenes*-positiv. Von den Käseproben aus Italien waren 17.4% positiv, aus Deutschland 9.2%, Österreich 10.0% und Frankreich 3.3%. Listerien wurden dabei v.a. in Weichkäse nachgewiesen. Überraschenderweise wurde in dieser Studie ein höheres Vorkommen von *L.monocytogenes* in Käse festgestellt, die aus pasteurisierter Milch hergestellt wurden (8.0%), als in Rohmilchkäse (4.8%).

In einer anderen Studie aus dem Jahr 2004 aus Spanien wurden während 4 Jahren verschiedene Lebensmittel auf *Listeria* spp. untersucht. Dabei wurde u.a. in Weichkäse eine Prävalenz von 8.1% positiver Proben festgestellt (Vitas et al., 2004).

Auch in Bezug auf den untersuchten Halbhartkäse zeigt die eigene Arbeit, dass in der Schweiz Lebensmittelinfektionen nach dem Genuss von Halbhartrohmilchkäse relativ unwahrscheinlich sind. Zudem wird die Rinde bei solchen Produkten durch die Konsumenten entfernt.

6.3 Schlussfolgerungen

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen von Rohmilch und Rohmilchkäse lassen sich für ein risikobasiertes mikrobiologisches Monitoringsystem dieser Biokäsereigenossenschaft folgende Schlüsse ziehen:

GKZ

- Bei allen Betrieben lässt sich eine niedrige GKZ in der Rohmilch feststellen
- Die Höhe der GKZ ist kein Indikator für die Höhe der *Enterobacteriaceae*- oder *S.aureus*-Prävalenz

Enterobacteriaceae

- Das Intervall 60/90Tage der Käsereifung scheint in Bezug auf die Inaktivierung der *Enterobacteriaceae* im Käse sehr wichtig zu sein, weshalb eine Reifedauer von mindestens 60 Tagen eingehalten werden sollte
- Die Höhe der Keimzahl an *Enterobacteriaceae* nach 60 Tagen Reifung ist dann nur noch durch einen tiefen *Enterobacteriaceae*-Ausgangskeimgehalt in der Milch zu beeinflussen (Melkhygiene, Kühlkette)

S.aureus

- Die Alpungsperiode hat einen signifikanten Einfluss auf die *S.aureus*-Prävalenz in den Bestandesmilchproben.
- Käsebehebungen zur Abschätzungen der Produktesicherheit hinsichtlich *S.aureus*-Enterotoxin sind nach 7 Tagen Reifedauer sinnvoll, da zu diesem Zeitpunkt die höchsten *S.aureus*-Keimzahlen erreicht werden bzw. am Ende der Reifung nach 60 Tagen. Beprobungen dazwischen lassen jedoch keine Aussagen zu.

7 Abbildungen



Abbildung 1: Käsereigebäude der Biokäsereigenossenschaft in Glurigen/VS, Schweiz



Abbildung 2: Lagerung des Bio-Gomser 11 im Reifekeller der Käserei

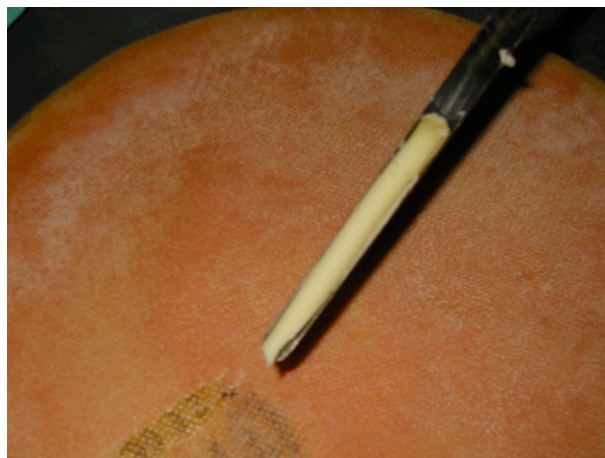


Abbildung 3: Entnahme der Käseprobe mit einem Käsebohrer

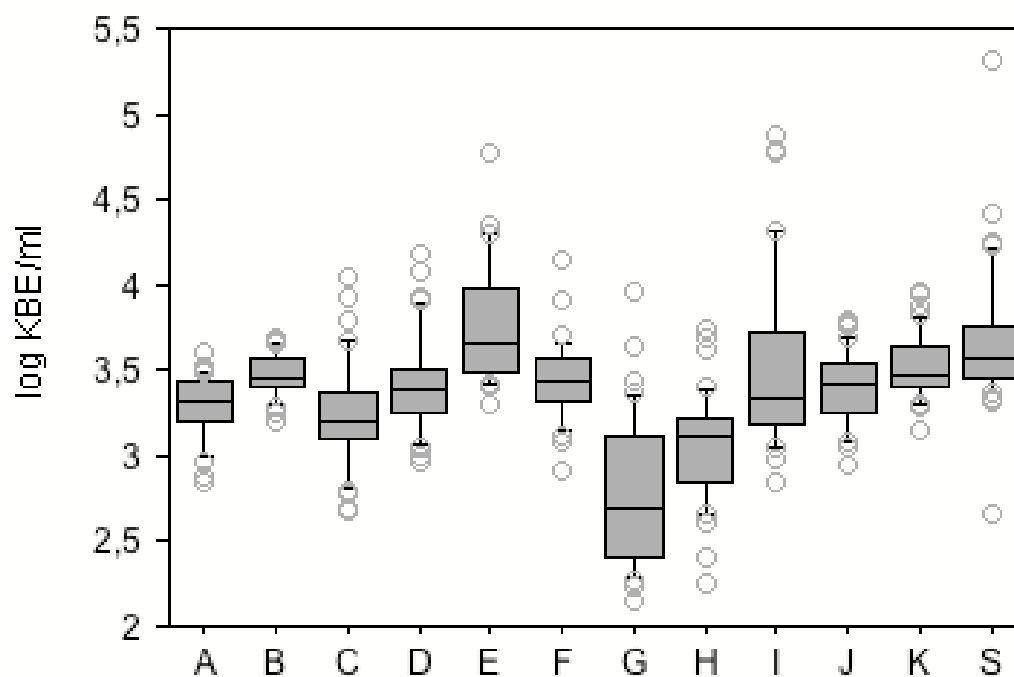


Abbildung 4: Boxplot-Darstellung der aeroben mesophilen GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilch S

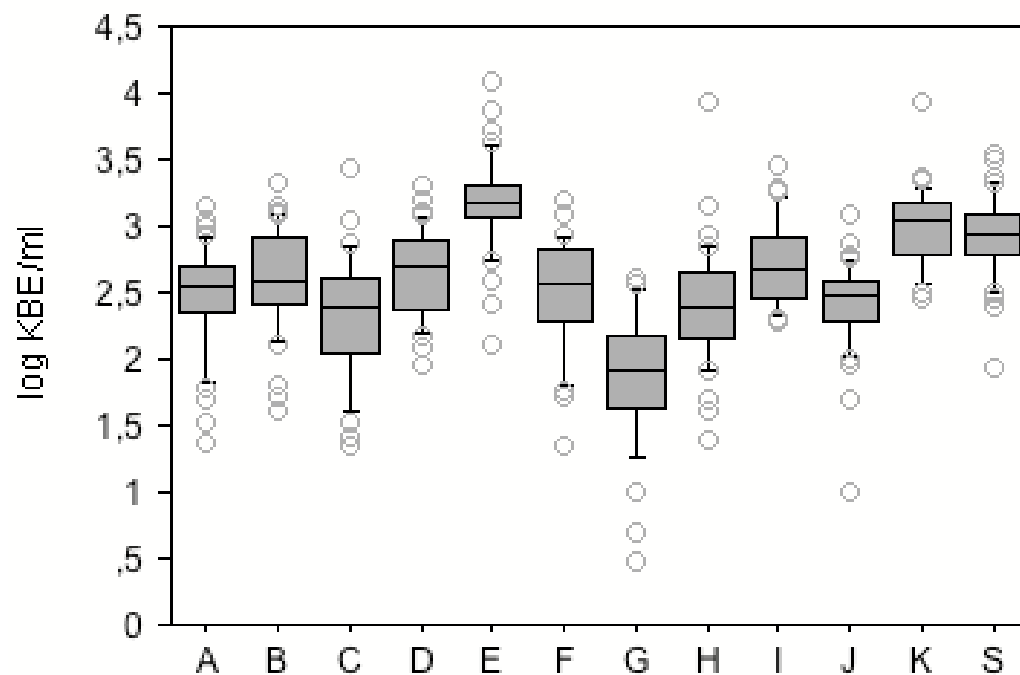


Abbildung 5: Boxplot-Darstellung der anaeroben mesophilen GKZ-Ergebnisse der Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K und der Sammelmilch S

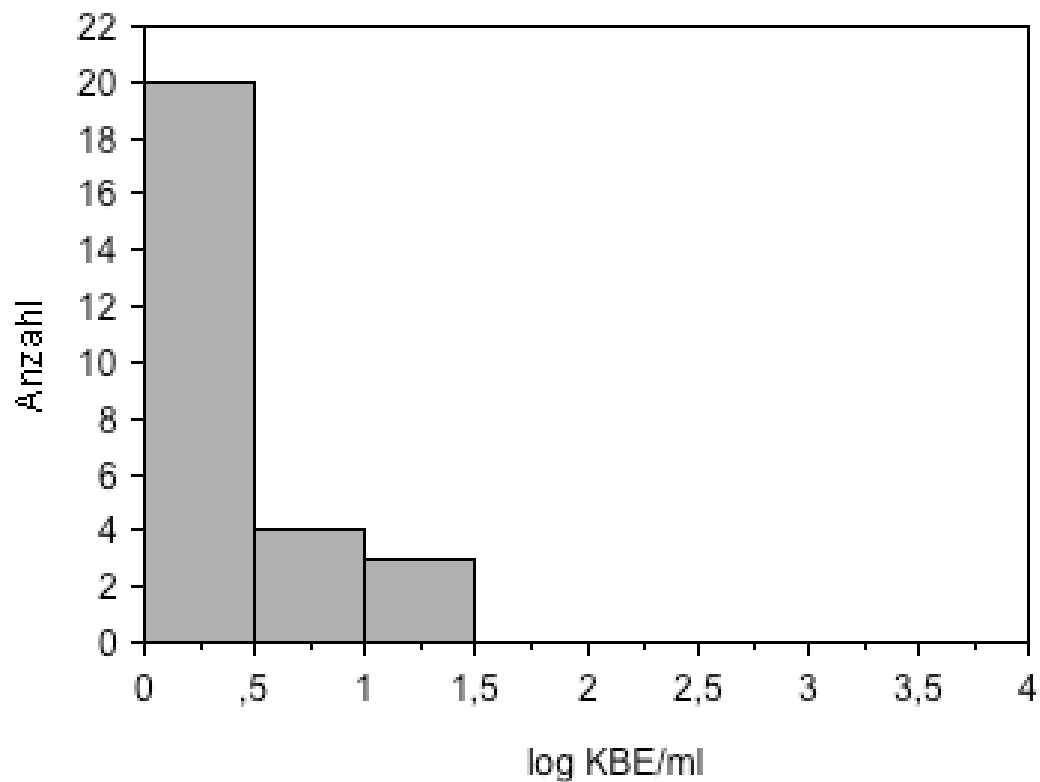


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb A**

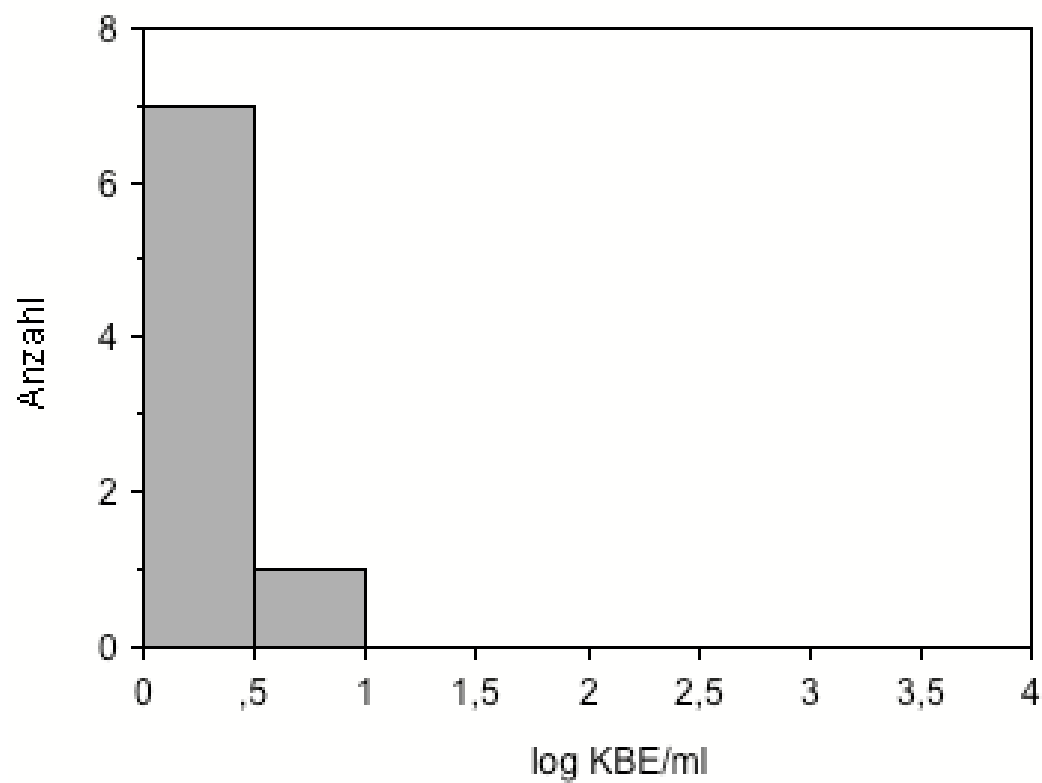


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb B**

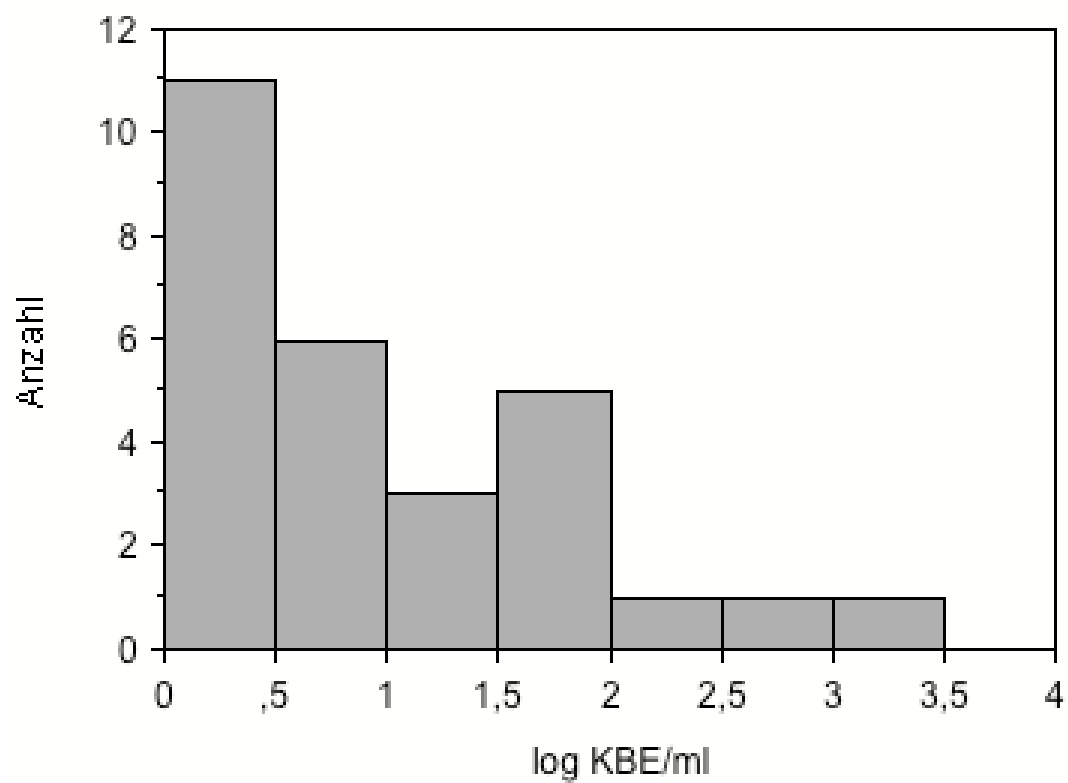


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb C**

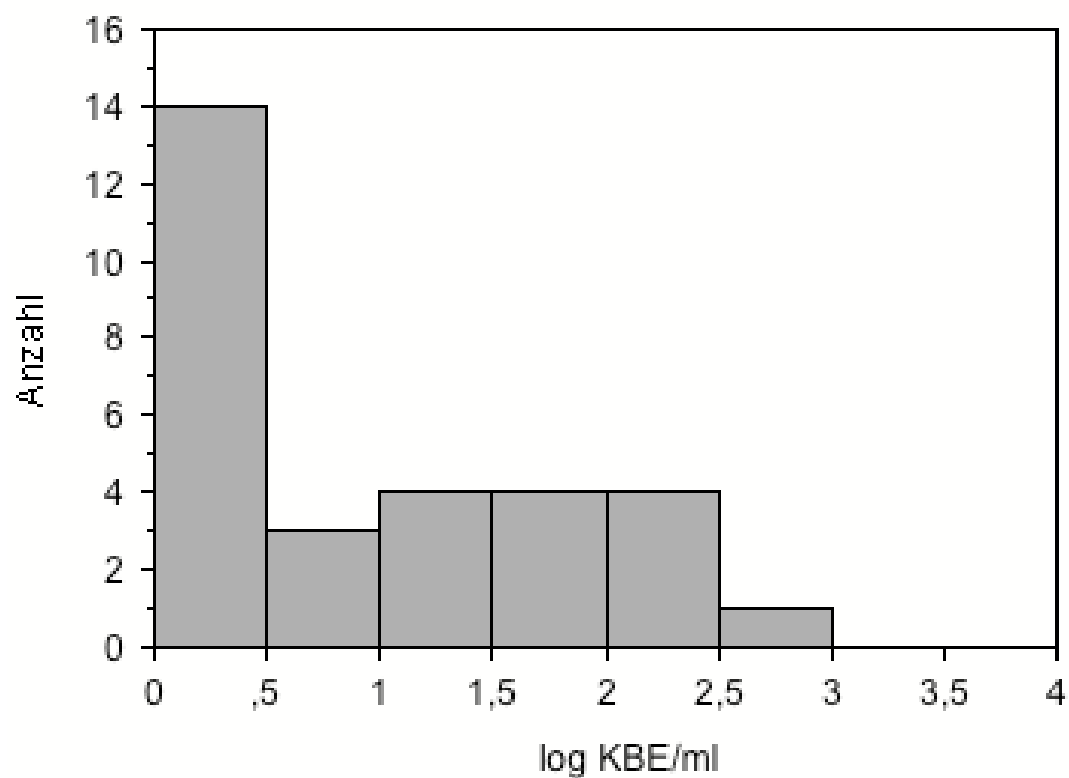


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb D**

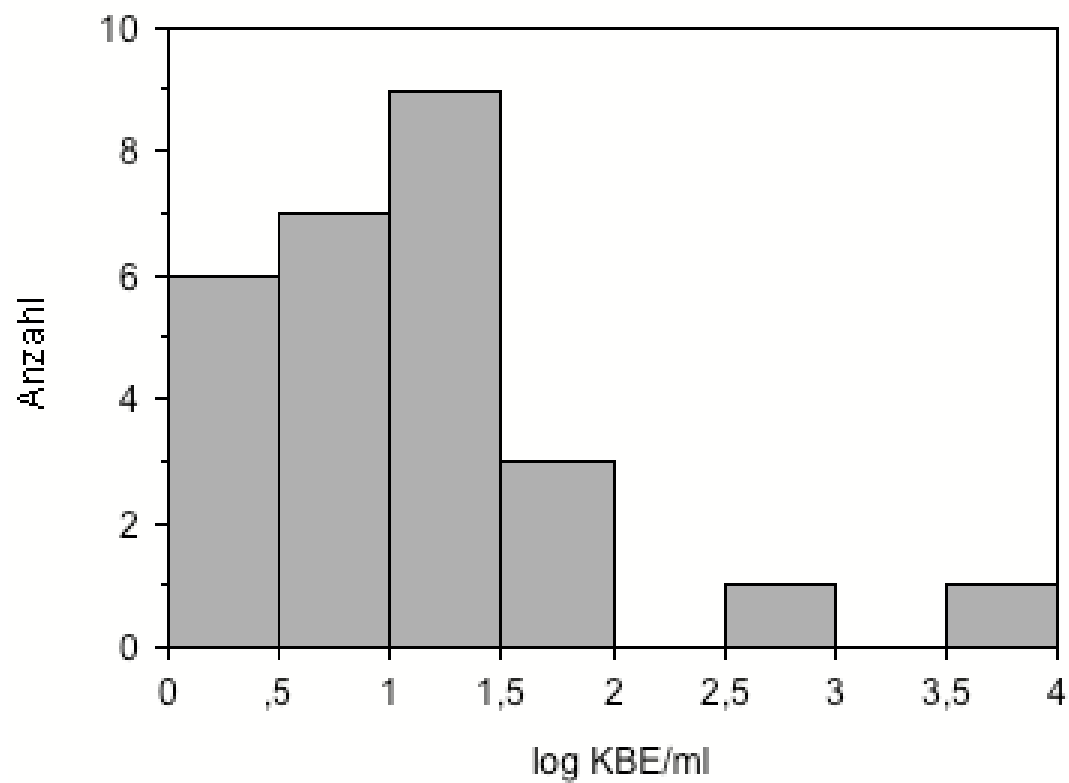


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb E**

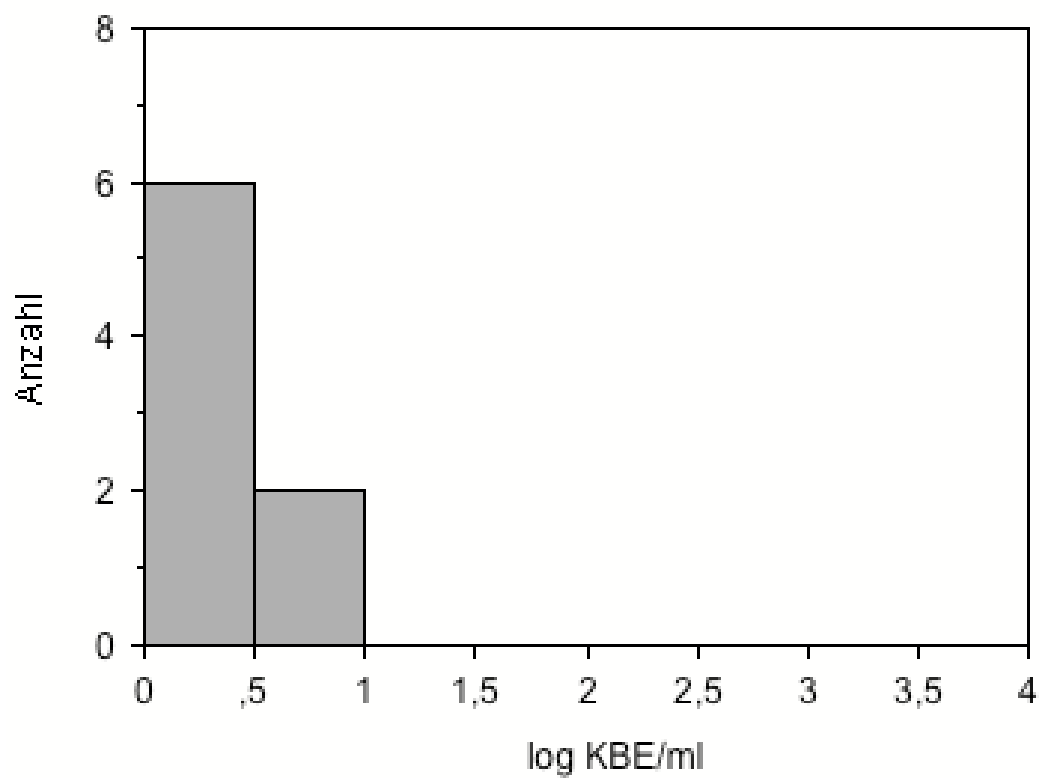


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb F**

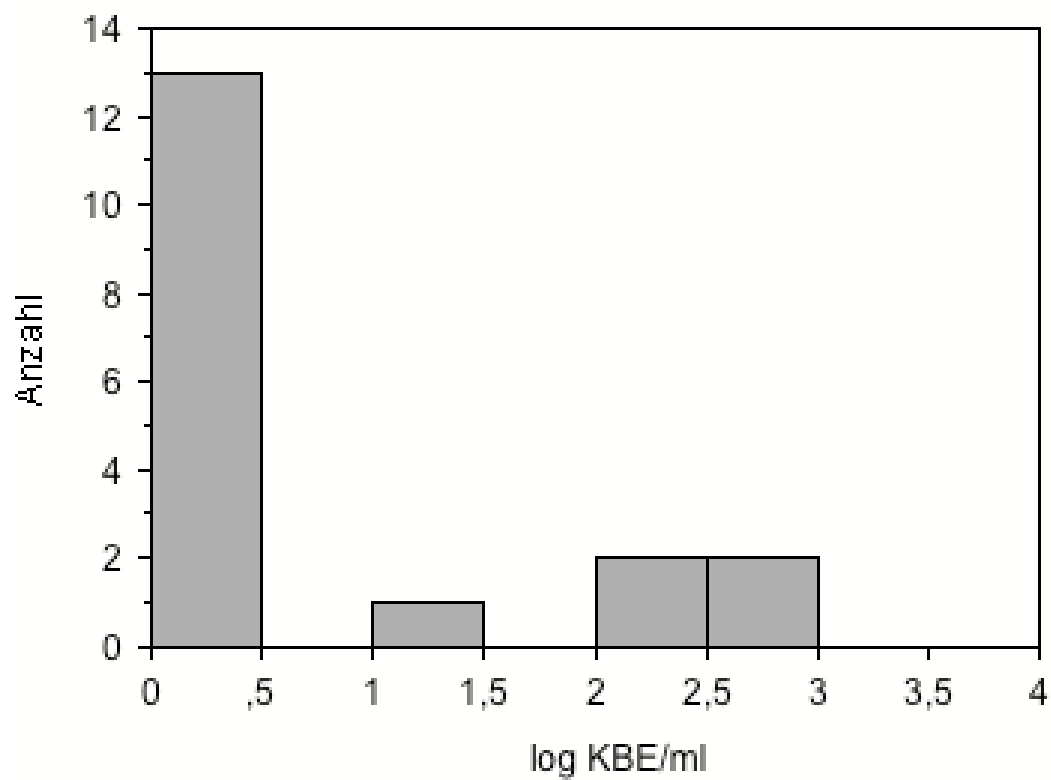


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb G**

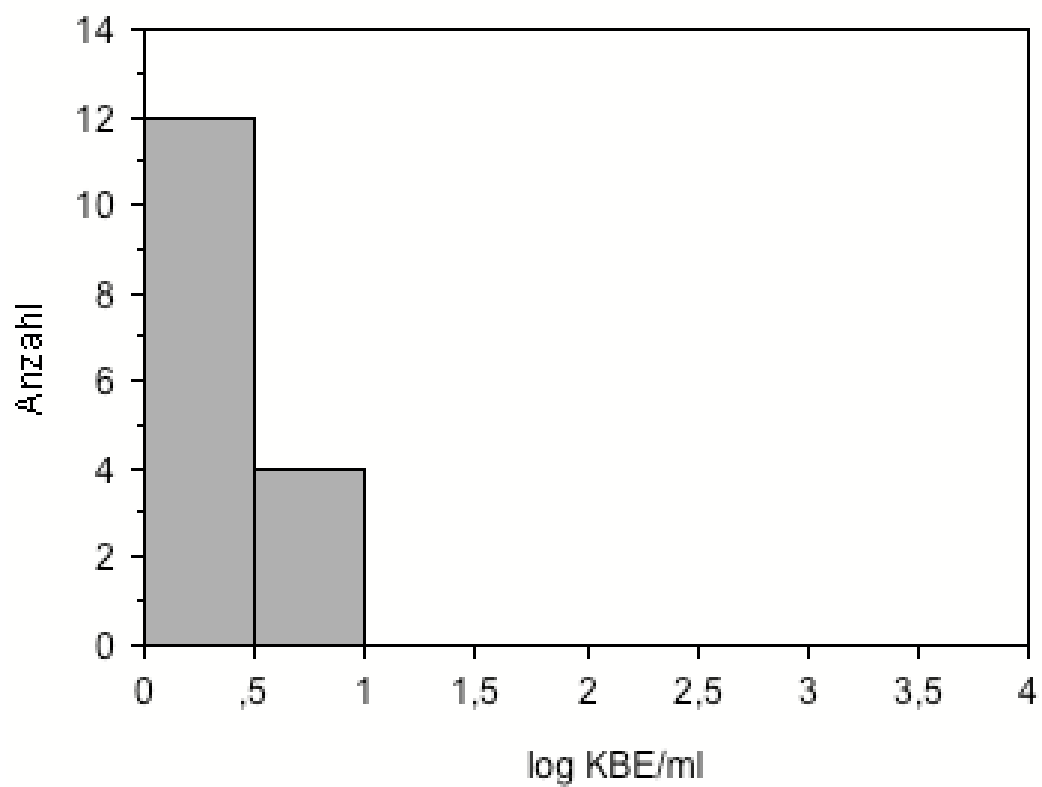


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb H**

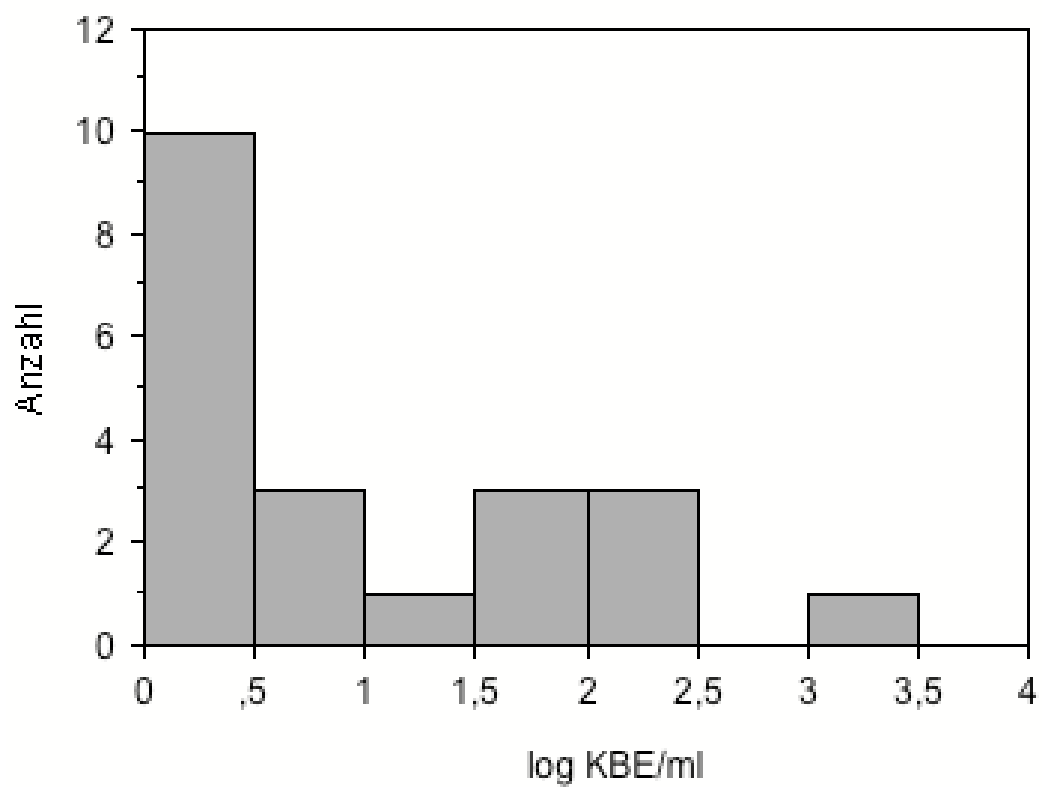


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb I**

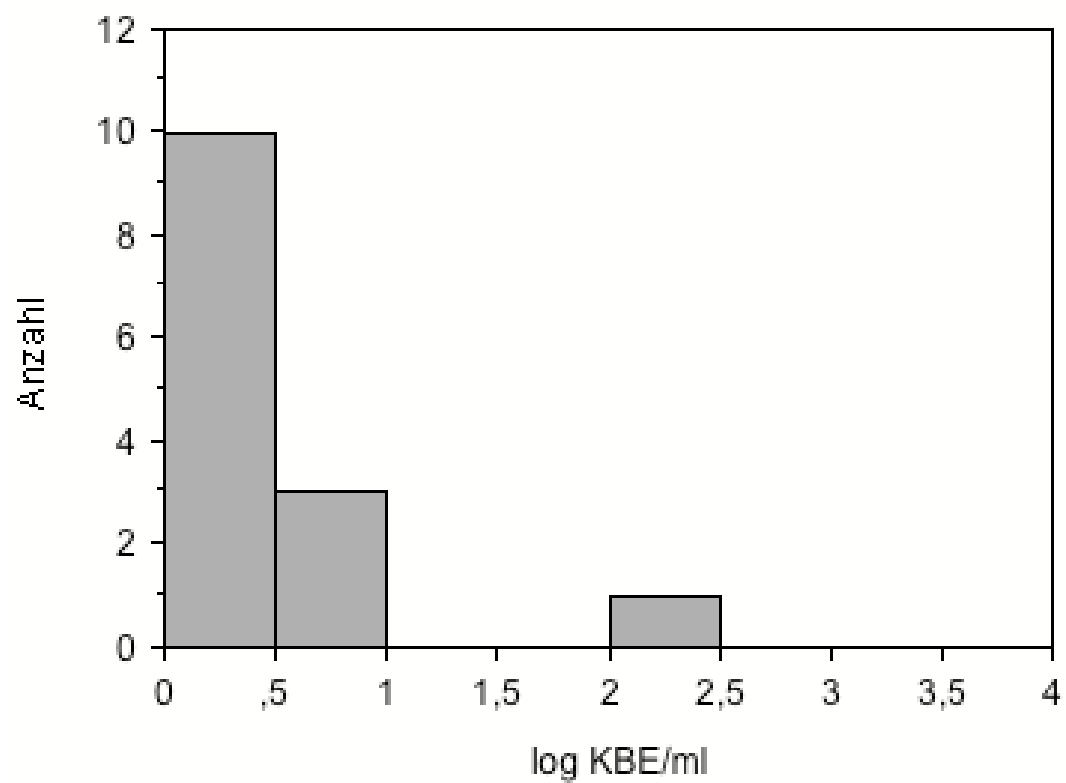


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb J**

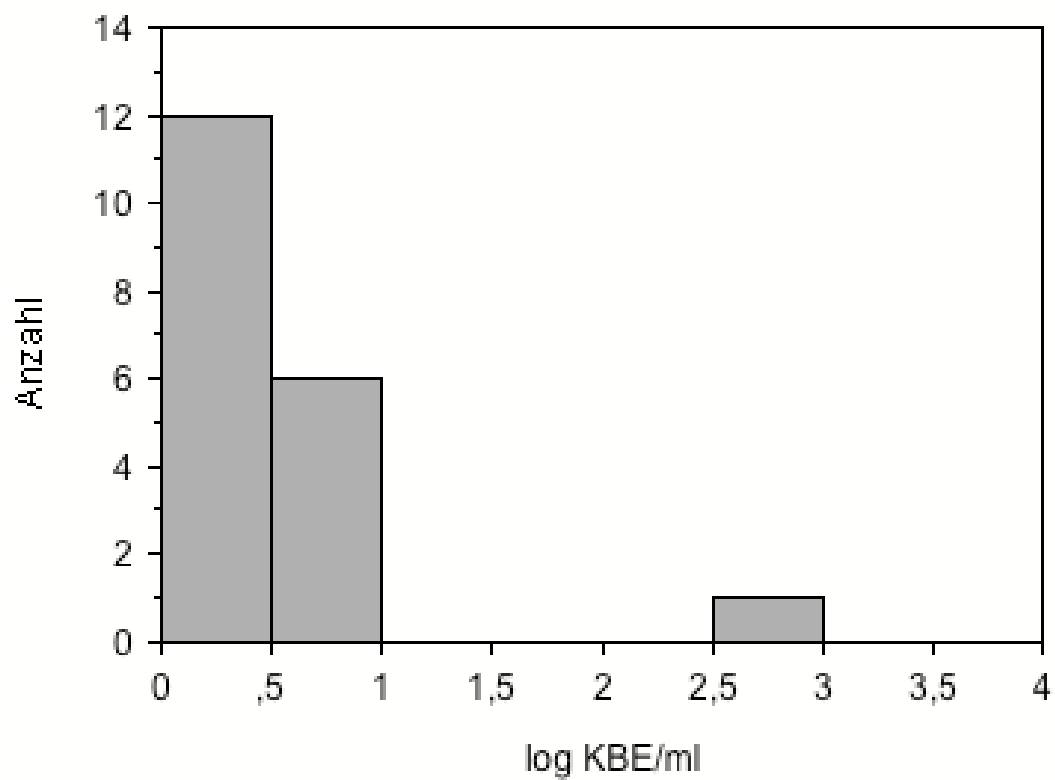


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb K**

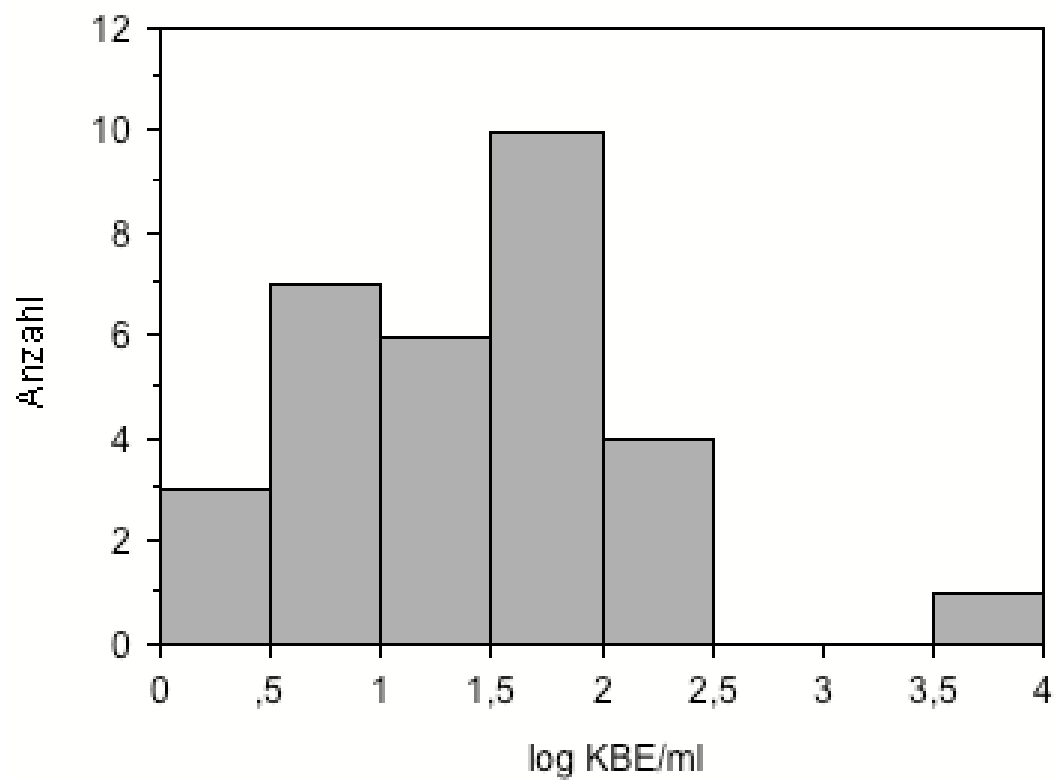


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *Enterobacteriaceae*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *Enterobacteriaceae*-positiven **Sammelmilchproben**

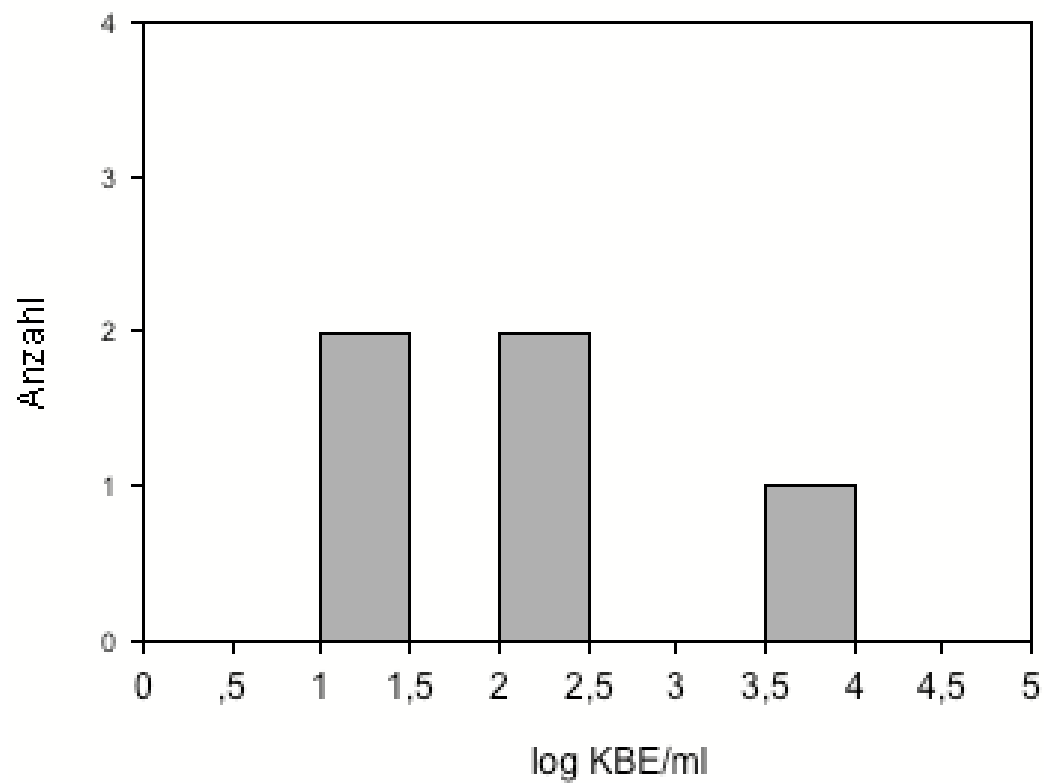


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb A**

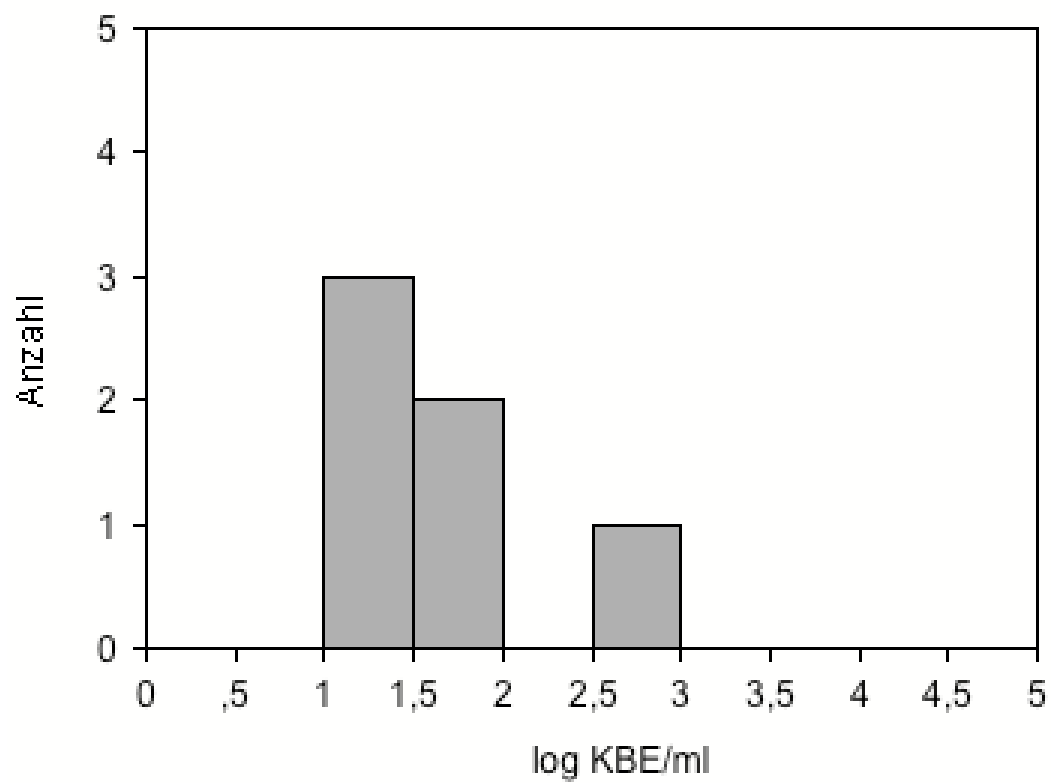


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb B**

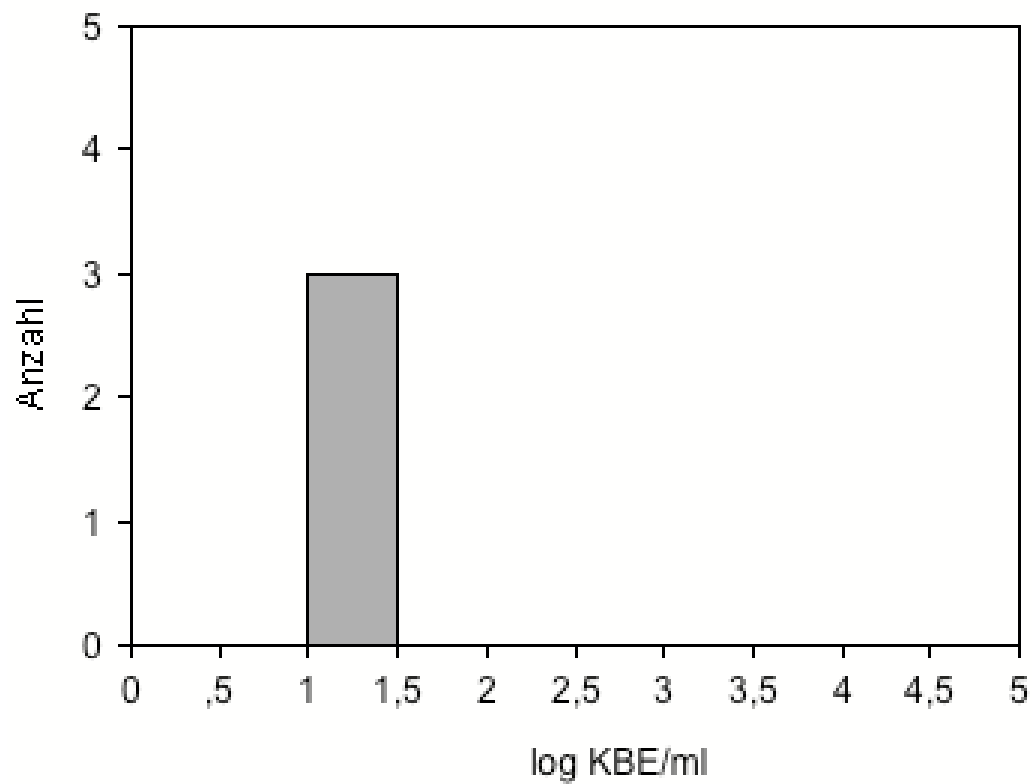


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S. aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S. aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb C**

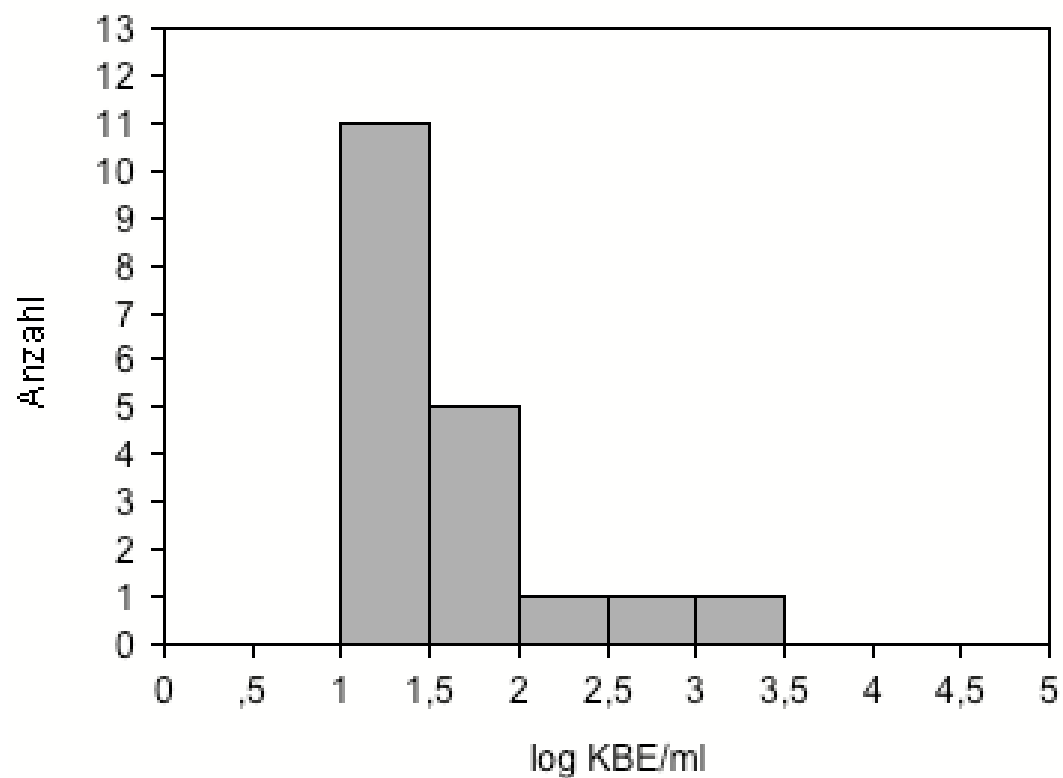


Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb D**

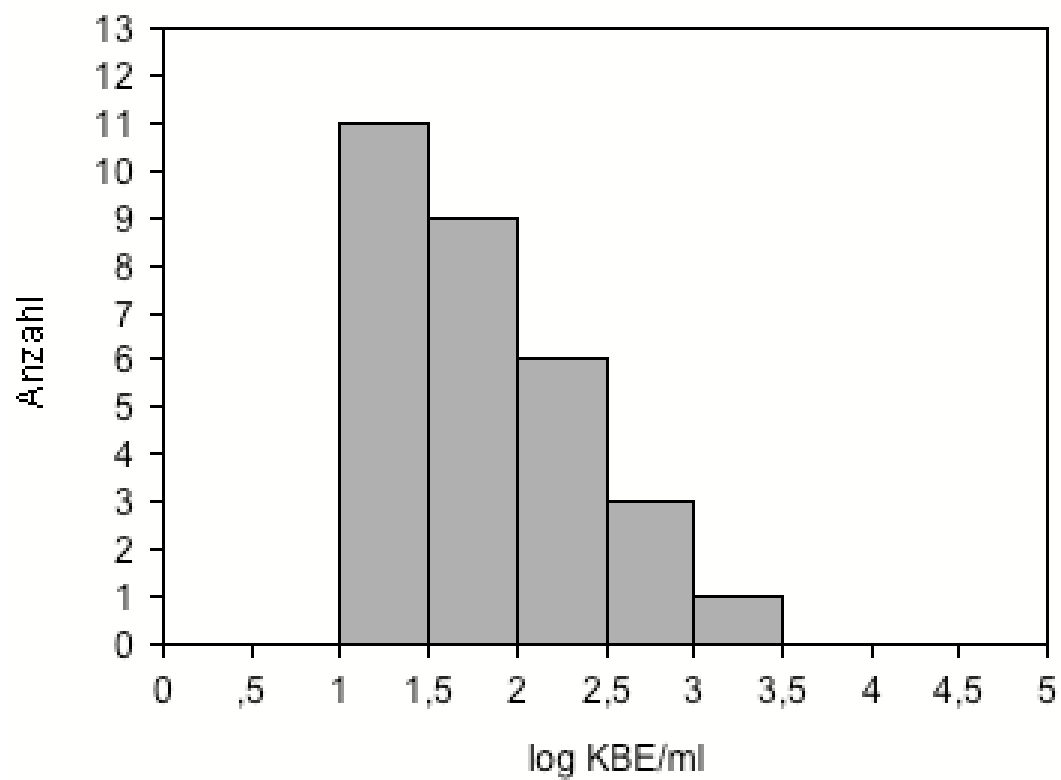


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S. aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S. aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb E**

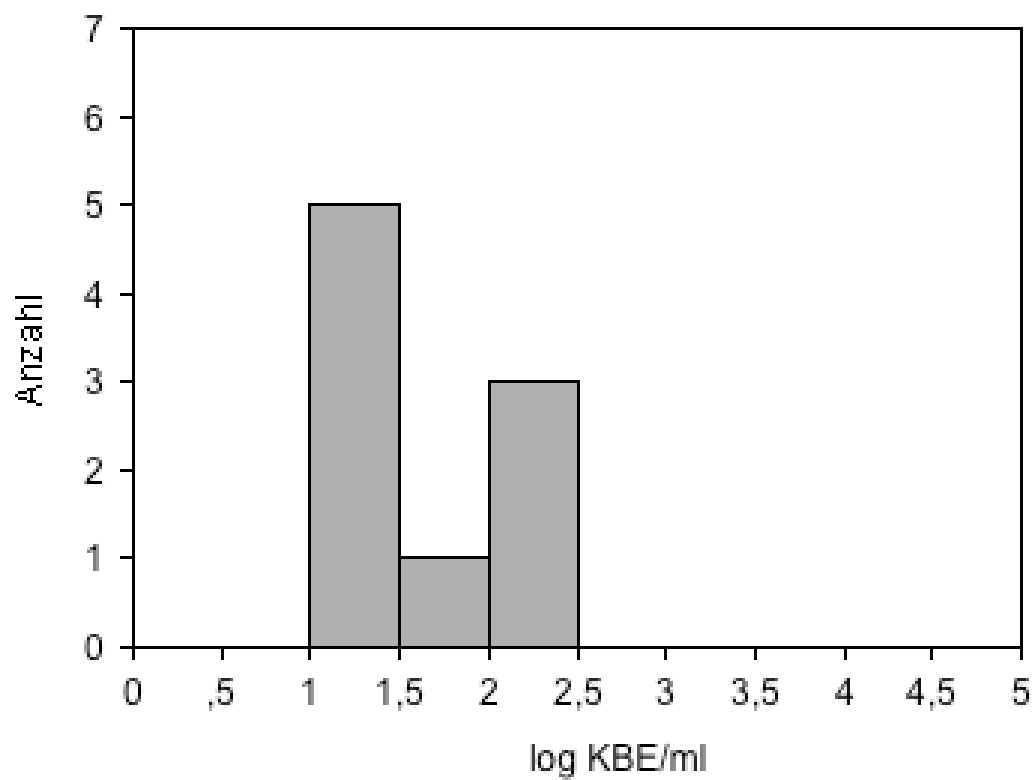


Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb F**

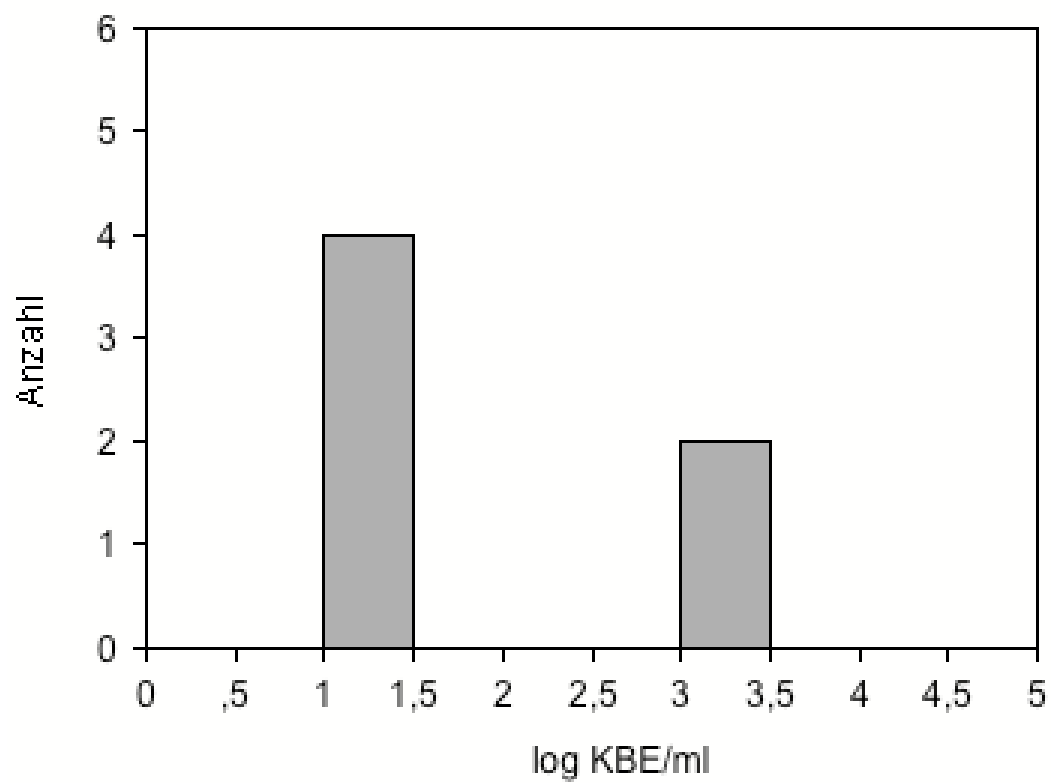


Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S. aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S. aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb G**

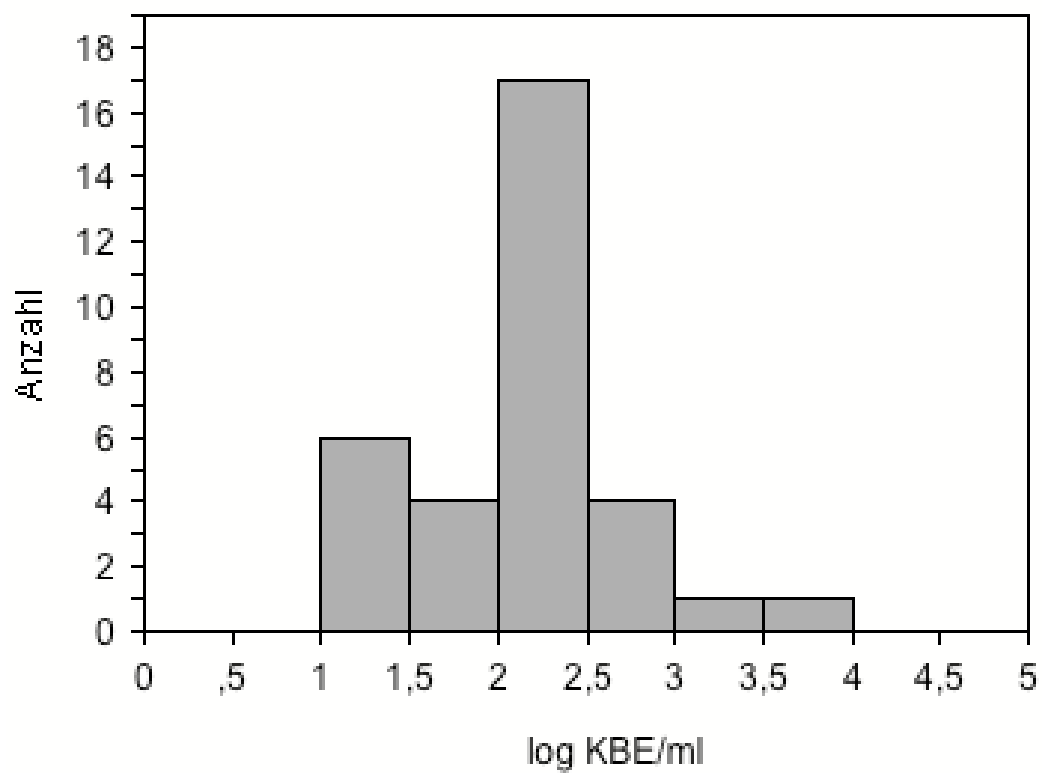


Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb H**

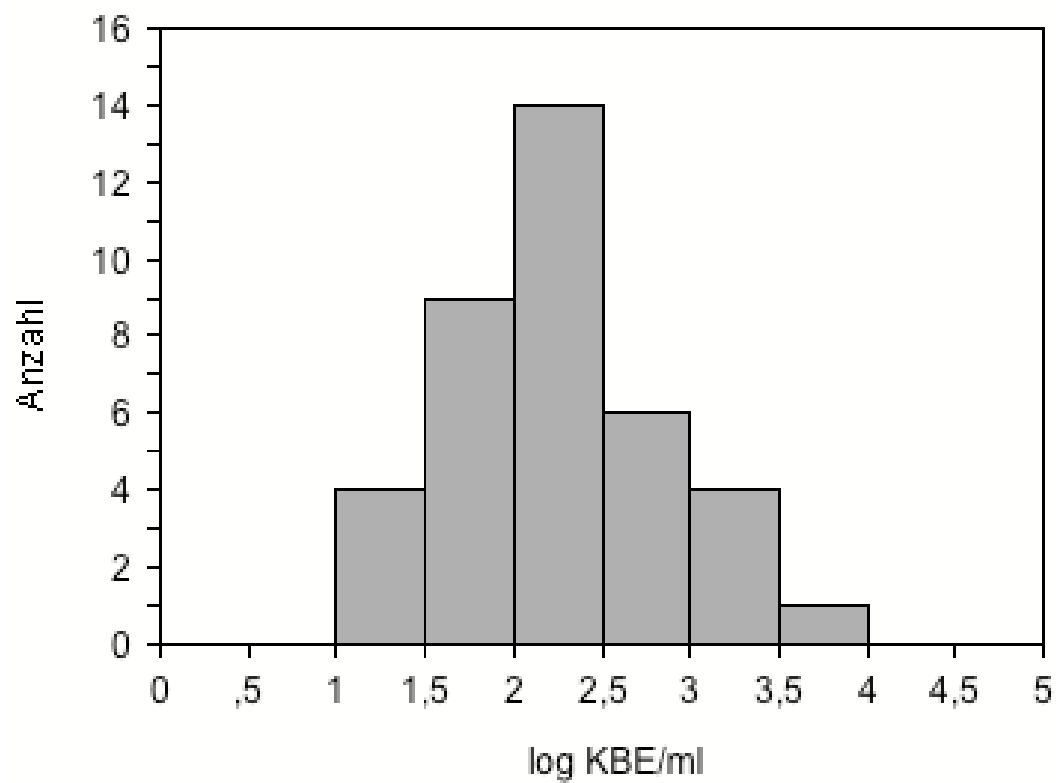


Abbildung 26: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S. aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S. aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb I**

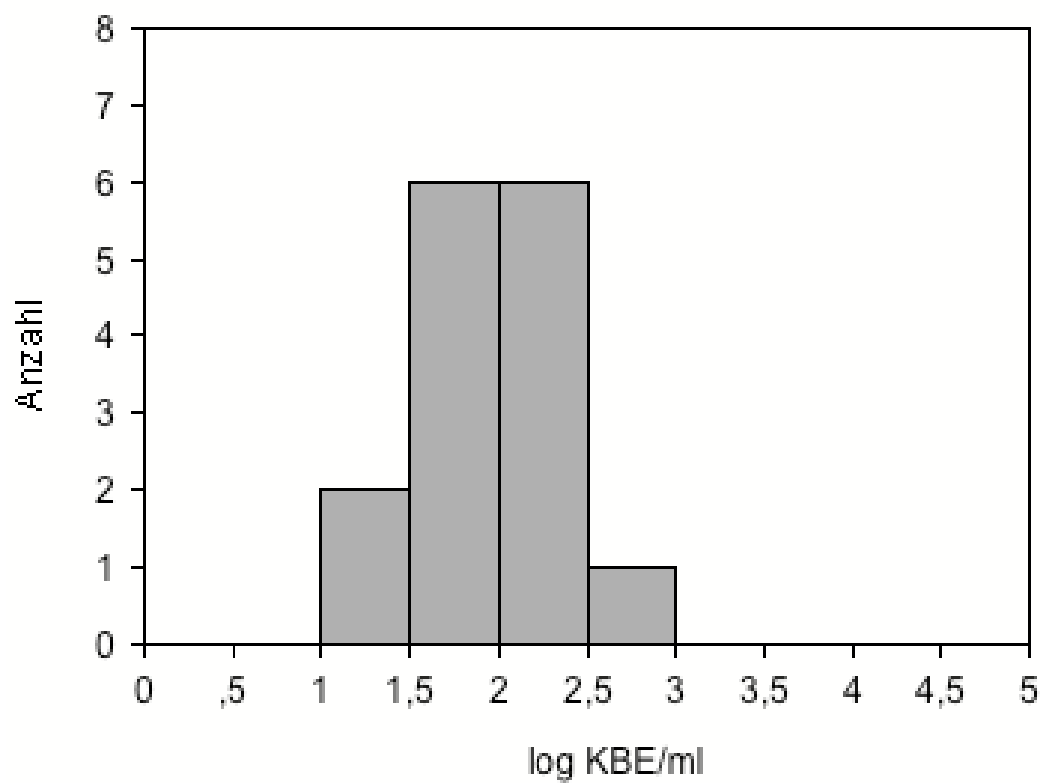


Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb J**

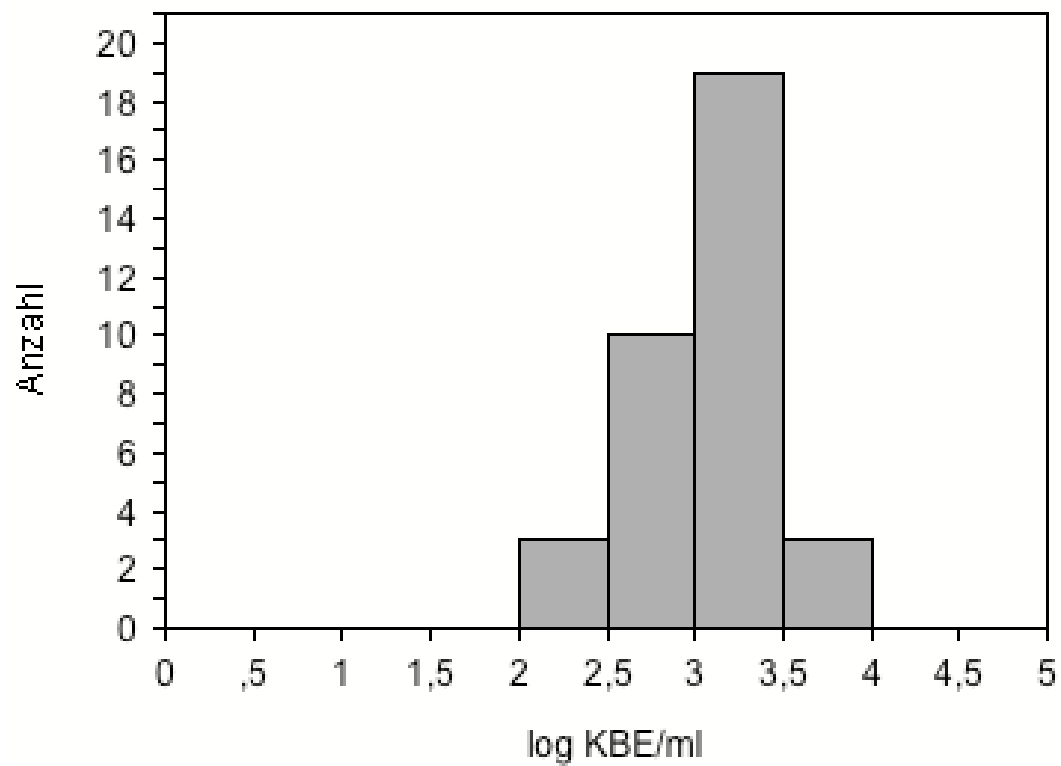


Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S.aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S.aureus*-positiven Rohmilchproben von **Betrieb K**

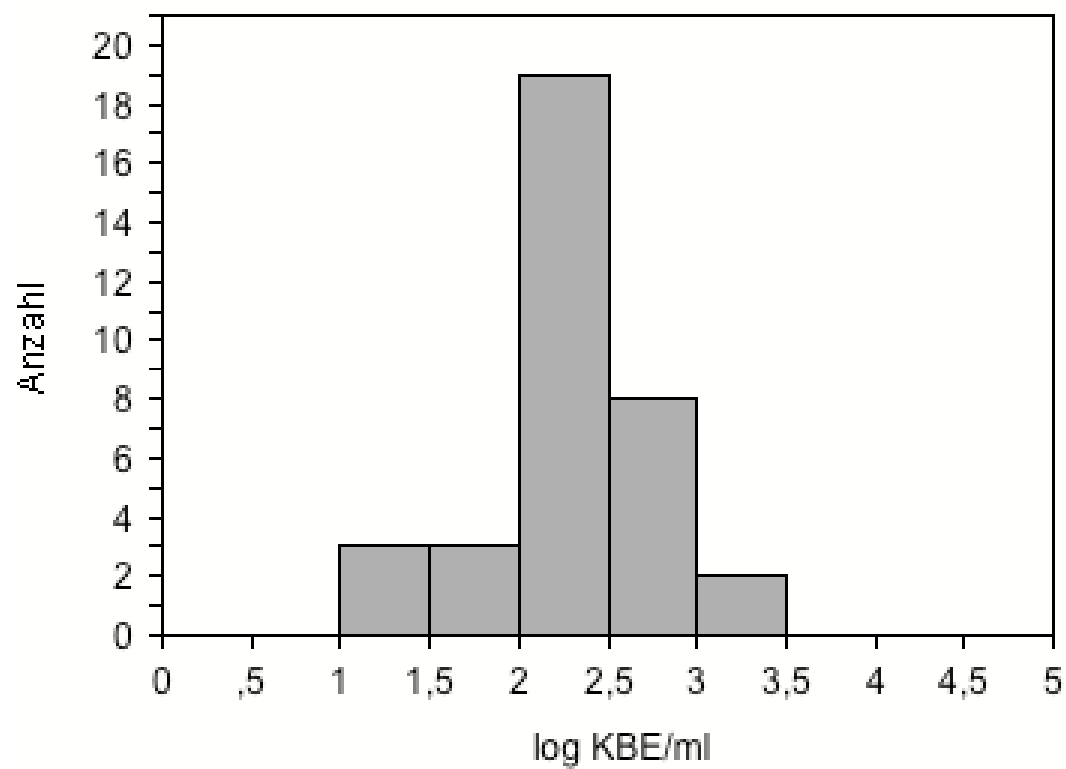


Abbildung 29: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der *S. aureus*-Ergebnisse (\log_{10} KBE/ml) der *S. aureus*-positiven **Sammelmilchproben**

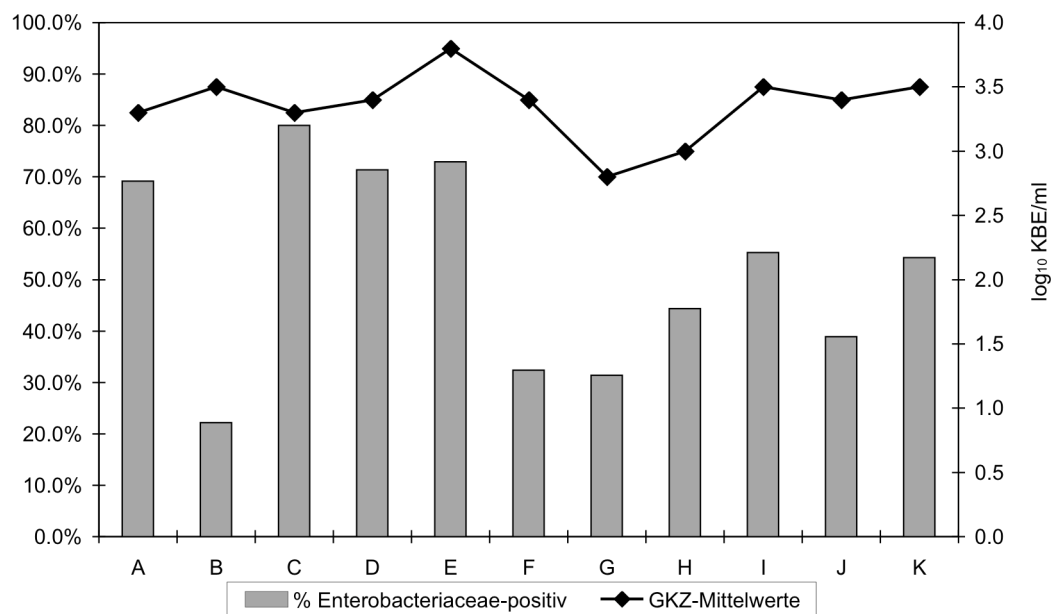


Abbildung 30: Zusammenstellung der GKZ-Mediane und der Prävalenz *Enterobacteriaceae*-positiver Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K

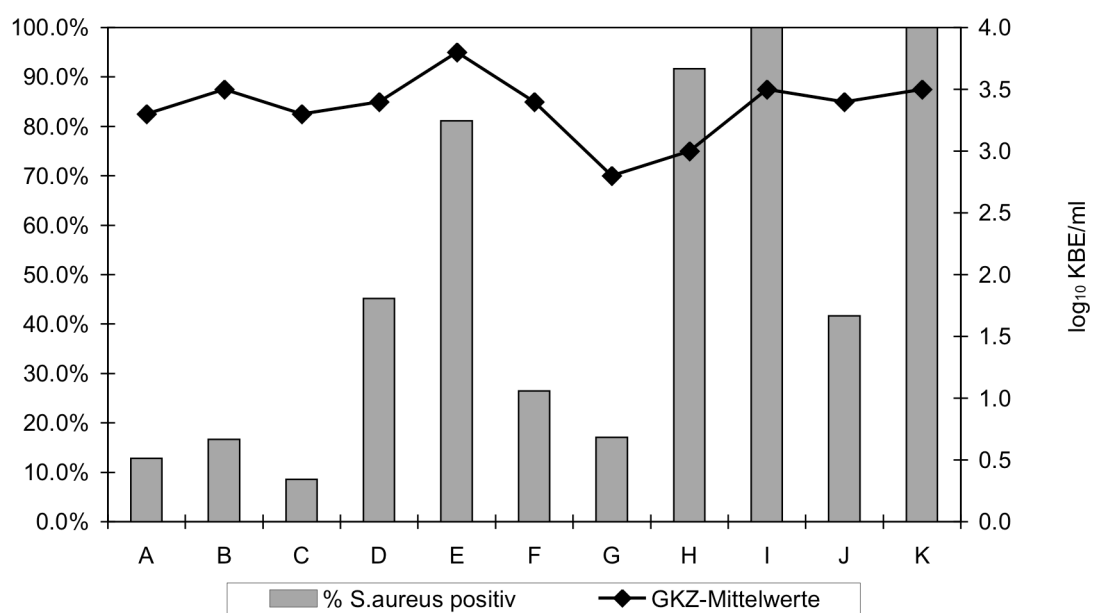


Abbildung 31: Zusammenstellung der GKZ-Mediane und der Prävalenz *S.aureus*-positiver Bestandesmilchproben der Betriebe A bis K

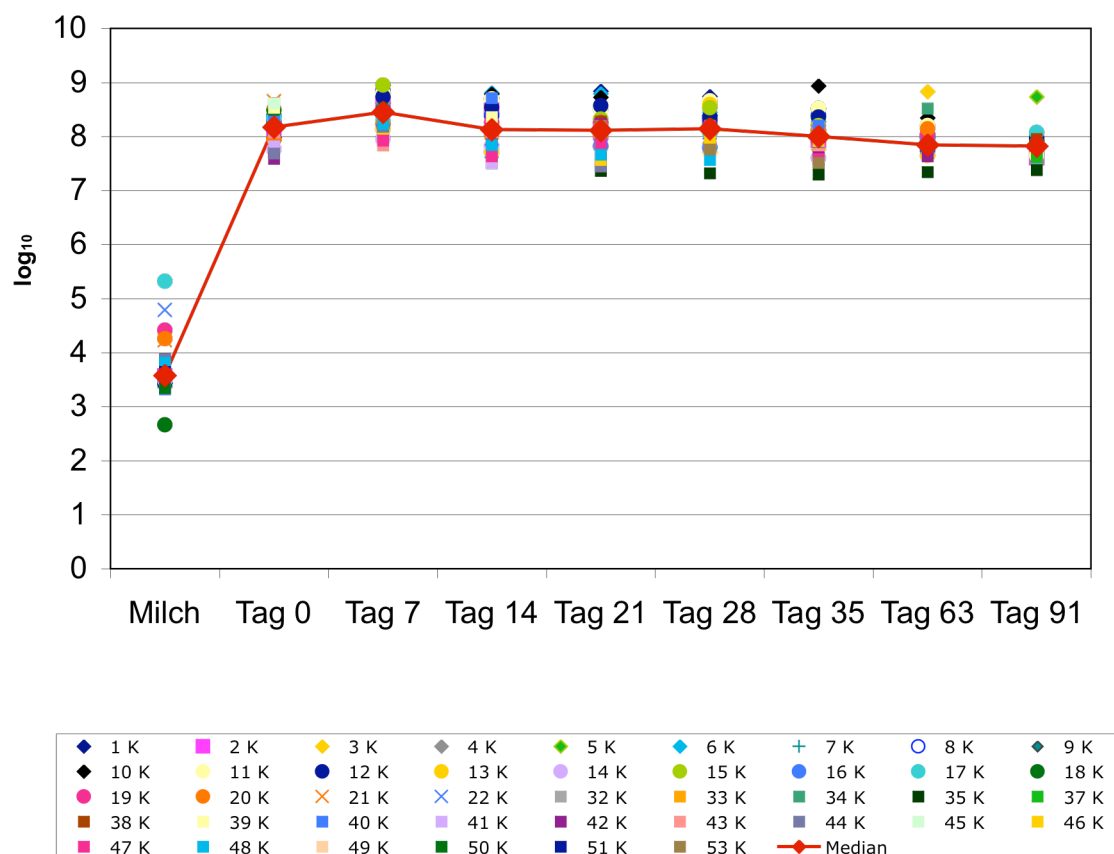


Abbildung 32: Verlauf der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (log KBE/ml bzw. g) in der Sammelmilch und im Biogomser über die Reifungszeit von 91 Tagen (K = Käsecharge)

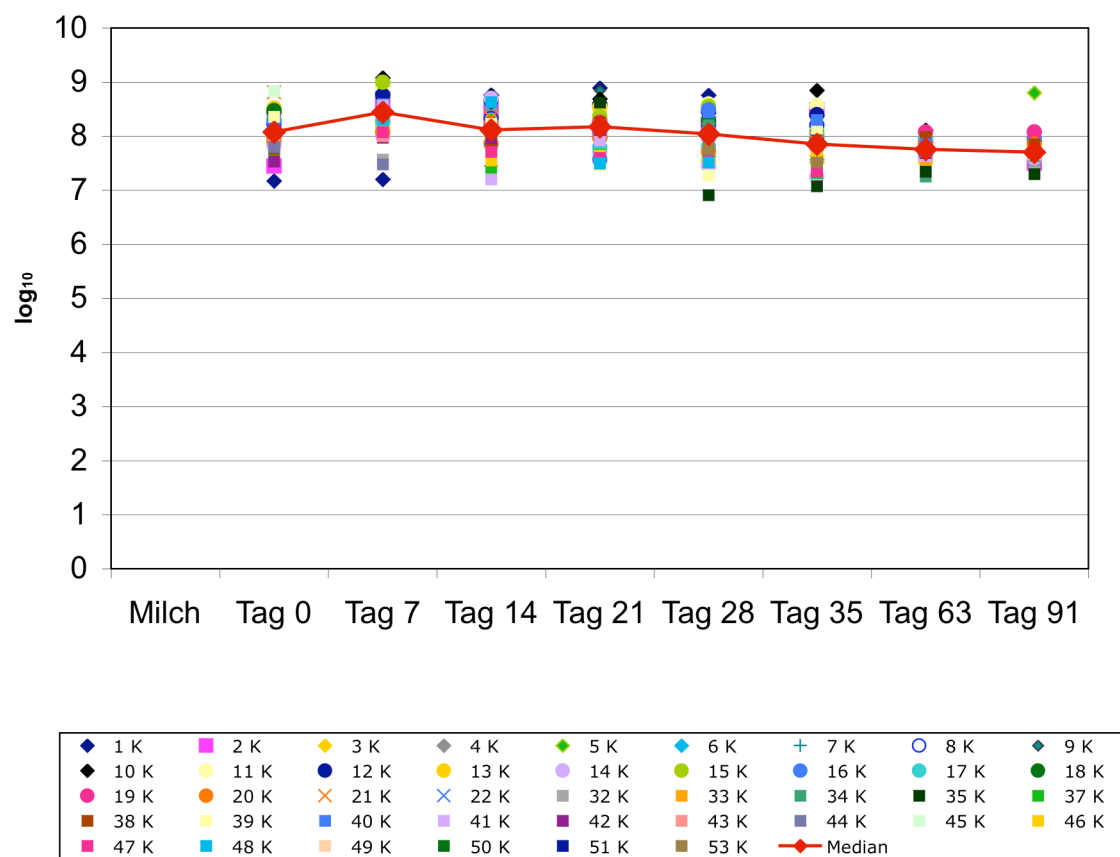


Abbildung 33: Verlauf der Keimzahlen der Milchsäurebildner (log KBE/g) im Biogomser über die Reifungszeit von 91 Tagen (K = Käsecharge)

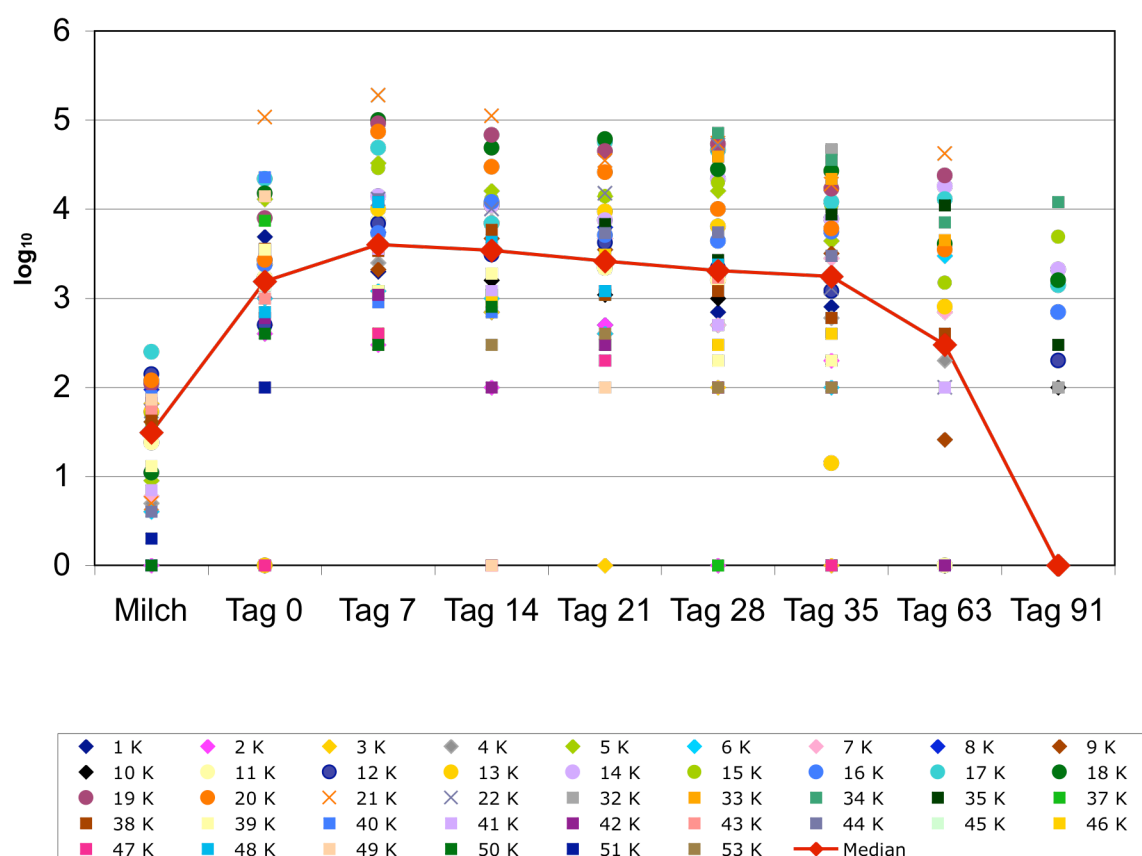


Abbildung 34: Verlauf der Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* (log KBE/ml bzw. g) in der Sammelmilch und im Biogomser über die Reifungszeit von 91 Tagen (K = Käsecharge)

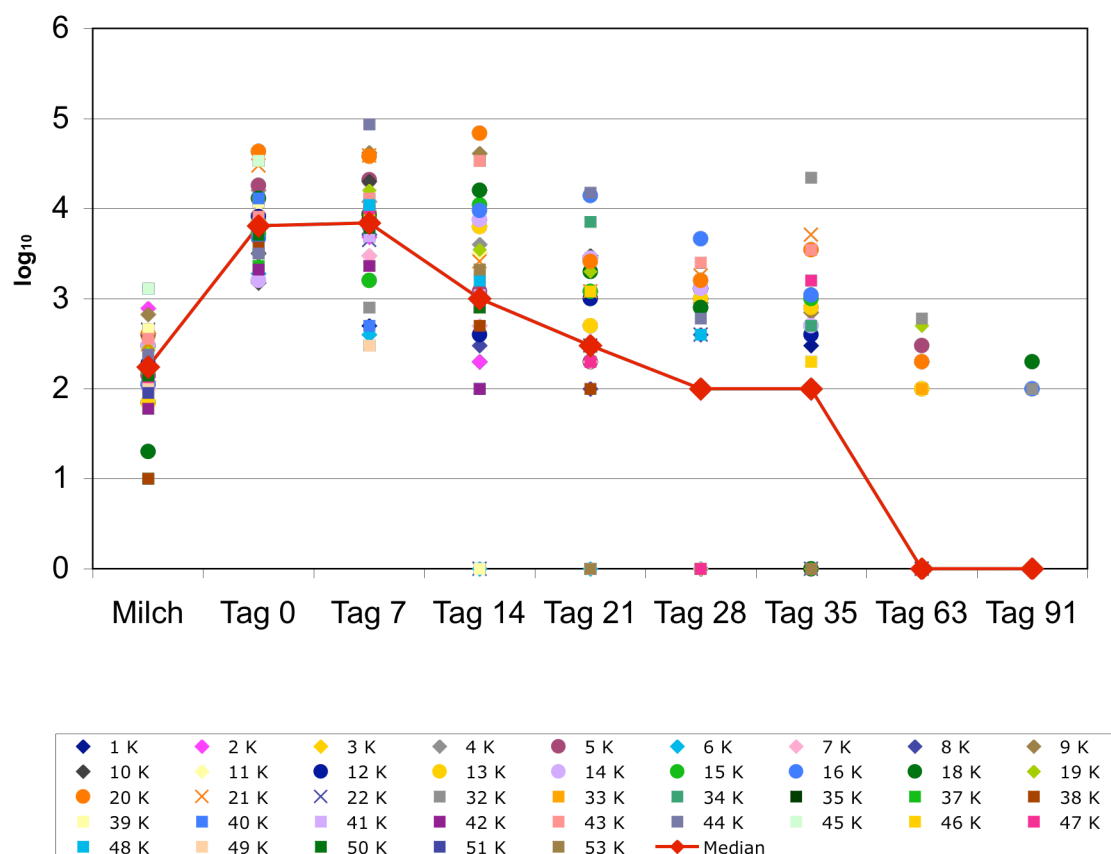


Abbildung 35: Verlauf der Keimzahlen der *S. aureus* (log KBE/ml bzw. g) in der Sammelmilch und im Biogomser über die Reifungszeit von 91 Tagen (K = Käsecharge)

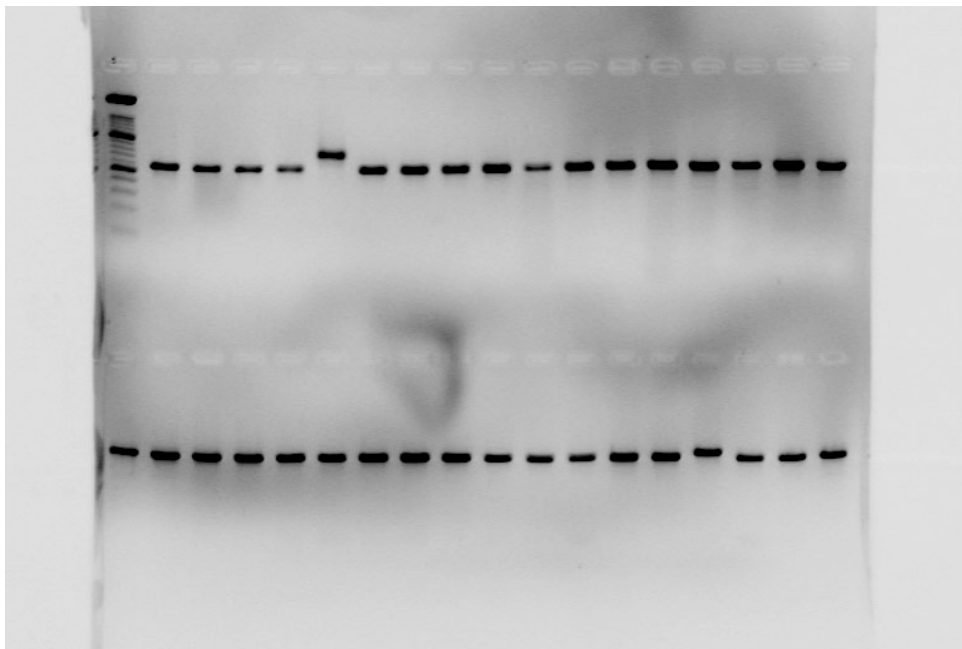


Abbildung 36a: Amplifikationsprodukte des Koagulase-(*coa*)-Gens ausgewählter *S.aureus*-Isolate.

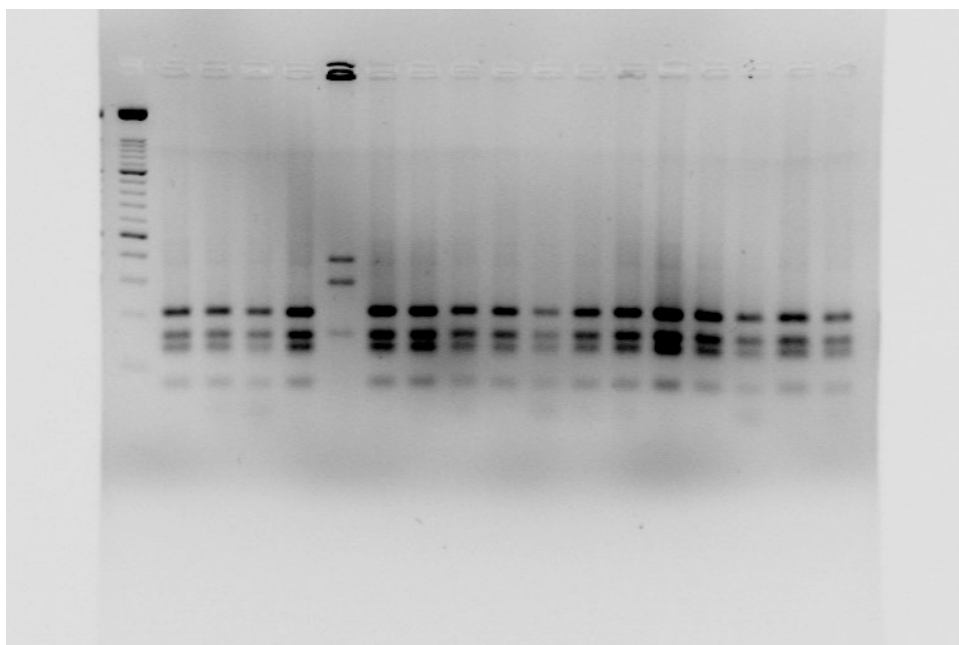


Abbildung 36b: CRP-Analyse ausgewählter *S.aureus*-Isolate. Die *coa*-Amplifikationsprodukte wurden mit *AluI* verdaut.

8 Literatur

- ADESIYUN A. A., WEBB L. A., ROMAIN H., KAMINJOLO J. S. 1996. Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in bulk milk, cows' faeces and effluents of dairy farms in Trinidad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 49:303-309.
- AHMED A. A.-H., MOUSTAFA M. K., MARTH E. H. 1983. Growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in whey from the manufacture of Domiati cheese. *J. Food Prot.* 47:260.
- ALLERBERGER, F., WAGNER M., SCHWEIGER P., RAMMER H. P., RESCH A., DIERICH M. P., FRIEDRICH A. W., KARCH H. 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Eurosurveillance.* 6:147-151.
- AROCHA M. M., MCVEY M., LODER S. D., RUPNOW J. H., BULLERMAN L. 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J. Food Prot.* 55:379-381.
- ASPERGER H. 1991. Zur Bedeutung des Kriteriums *Staphylococcus aureus* in Käse. *Milchwirtschaftliche Berichte* 108:138-144.
- ASPERGER, H. 1994. *Staphylococcus aureus*. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. *Int. Dairy Fed.* ISBN: 92 9098 016 8, 24-42.
- ASPERGER H. 1986. Wirkungen von Milchsäurebakterien auf andere Mikroorganismen: Ein Überblick. *Oesterr. Milchwirtschaft.* 41, Beilage 1:1.
- BACHMANN H.P., SPAHR U., 1995. The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *J. Dairy Sci.* 78:476-483.
- BALABAN N., RASOOLY A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1-10.
- BALJER, G., WIELER, L. H. 1998. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - Aktuelle Information zu einem neuen, medizinisch bedeutsamen Zoonoseerreger. *Lohmann Information* 4/98, 19.
- BARZA M., 1985. Listeriosis and milk. *New England J. Med.* 312:438.
- BECKER, H., GANG-STILLER, K., TERPLAN, G. 1989. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk with special reference to the clumping factor. *Neth. Milk Dairy J.* 43:355-366.

- BELL B. P., GOLDOFT M., GRIFFIN P. M., DAVIS M. A., GORDON D. C., TARR P. I., BARTLESON C. A., LEWIS J. H., BARRETT T. J., WELLS J. G., ET AL. 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *Jama* 272:1349-1353.
- BEUTIN L., GEIER D., ZIMMERMANN, S., KARCH H. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.*, 33:631-635.
- BOCKEMÜHL J., KARCH H., RÜSSMANN H., ALEKSIC S., WISS R., EMMERICH P. 1990. Shiga-like (Verotoxin-)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8. Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom. *Bundesgesundheitsblatt* 33:3-6.
- BOCKEMÜHL J., KARCH H. 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). *Bundesgesundheitsblatt* 8:290-296.
- BOERLIN P., MCEWAN S. A., BOERLIN-PETZOLD F., WILSON J. B., JOHNSON R. P., GYLES C. L. 1999. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37:497-503.
- BONE F. J., BOGIE D., MORGAN-JONES S. C. 1989. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiol. Infect.* 103:449-458.
- BORCZYK A. A., KARMALI M. A., LOIR H., DUNCAN L. M. C. 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 8524:98.
- BURNENS A. P., FREY A., LIOR H., NICOLET J. 1995. Prevalence and clinical significance of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. *J. Vet. Med. B.* 42:311-318.
- BUSATO A., LENTZE T., HOFER D., BURNENS A. P., HENTRICH B., GAILLARD C. 1998. A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf herds. *Zentralbl. Veterinärmed. (B)*, 45:519-528.
- BUZBY J. C., ROBERTS T. 1996. ERS Updates U.S. Foodborne disease costs for seven pathogens. *Food Rev.* 20-25.
- CAPRIOLI A., LUZZI I., GIANVITI H., RÜSSMANN H., KARCH H. 1995. Phenotyping of verotoxin 2 (VT2)-producing *Escherichia coli* causing haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome by direct analysis of patients' stools. *J. Med. Microbiol.* 43:348-353.

- CHAPMAN P. A., WRIGHT D. J. HIGGINS R. 1993. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E coli* O157. *Vet. Rec.* 133:171-172.
- CHIOU C., HSIAO-LUN W., YANG L. 2000. Comparison of pulsed-field gel elektrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *S.aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2186-3500.
- DE VRIES J., STRIKWERDA R. 1956. Ein Fall klinischer Euter-Listeriose beim Rind. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infekt. Hyg.* 167:229-232.
- DOMINGUEZ RODRIGUEZ L., FERNANDEZ GARAYZABAL J. F., VAZQUEZ BOLAND J. A., RODRIGUEZ FERRI E., SUAREZ FERNANDEZ G. 1985. Isolation of microorganisms of the species *Listeria* from raw milk intended for human consumption. *Can. J. Microbiol.* 31:938-941.
- DOYLE M. P. 1991. A new generation of foodborne pathogens. *Bol. Assoc. Med. PR.* 83:561-563.
- DOYLE M. P., SCHOENI J. L. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2394-2396.
- ECKNER K.F., ZOTTOLA A., 1991. The behavior of selected microorganisms during manufacture of high moisture Jack cheeses from ultrafiltrated milk. *J. Dairy Sci.* 74:2820-2830.
- FARBER J.M., PETERKIN P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.
- FARBER J. M., SANDERS G. W., MALCOLM S. A. 1988. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Can. J. Microbiol.* 34:95-100.
- FLEMING D. W., COCHI S. L., MACDONALD K. L., BRONDUM J., HAYES P. S., PLIKAYTIS B. D., HOLMES M. B., AUDURIER A., BROOME C. V., REINGOLD A. L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312:404-407.
- FORSMAN P., TILSALA-TIMISJARVI A., ALATOSSAVA T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143: 3491-3500.
- FURTADO M. M., CHANDAN R. C. 1985. Ripening changes in a blue-mold surface ripend cheese from goat's milk. *J. Food Sci.* 50:545.
- GENIGEORGIS C. A. 1989. Present stage of knowledge on staphylococcal intoxication. 122. *Int. J. Food Microb.* 9:327.
- GILMOUR A., HARVEY J. 1990. Staphylococci in milk and milk products. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 19:147S-166S.

- GITTER M., BRADLEY R. , BLAMPIED P. H. 1980. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *Vet. Rec.* 107:390-393.
- GOMEZ D., MILIWEBSKI E., FERNANDEZ PASCUA C., BASCHKIER A., MANFREDI E., ZOTTA M., NARIO F., PIQUIN A., SANZ M., ETCHEVERRIA A., PADOLA N., PARMA A., RIVAS M. 2002. Isolation and charakterisation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses. *Rev. Argent. Microbiol.* 34:66-71.
- GOMEZ-LUCIA E., BLANCO J. L., GOYACHE J., DE LA FUENTE R., VAZQUEZ J. A., FERRI E. F., SUAREZ G. 1986. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* S6 in Manchego type cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 61:499-503.
- GOMEZ-LUCIA E., GOYACHE J., BLANCO J. L., VADILLO S., GARAYZABAL J. F., SUAREZ G. 1987. *Staphylococcus aureus* growth and survival during curding of Manchego type cheese produced with normal and subnormal starter activity. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184:304-307.
- GOMEZ-LUCIA E., GOYACHE J., ORDEN J. A., DOMENECH A., JAVIER HERNANDEZ F., RUIZ-SANTA QUITERIA J. A., LOPEZ B., BLANCO J. L., SUAREZ G. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.* 75:19-26.
- GRIFFIN P. M., OSTROFF S. M., TAUXE R. V., GREENE K. D., WELLS J. G., LEWIS J. H., BLAKE P. A. 1988. Illness associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 109:705-712.
- HAHN G. 1989. *Staphylococcus aureus* und Staphylokokken-Enterotoxine. In *Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft* (ed. W. Heeschen), S. 97-113. Behr's Verlag, Hamburg.
- HASSAN L., MOHAMMED H. O., McDONOUGH P. L., GONZALEZ R. N. 2000. A cross-sectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. *J. Dairy Sci.* 83:2441-2447.
- HAYES P. S., FEELEY J. C., GRAVES L. M., AJELLO G. W., FLEMING D. W. 1986. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:438-440.
- HESELBARTH J., SCHWARZ S. 1995. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet. Microbiol.* 45:11-17.
- HILBORN E. D., MSHAR P. A., FIORENTINO T. R., DEMBEK Z. F., BARRETT T. J., HOWARD R. T., CARTTER M. L. 2000. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with

- consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol. Infect.* 124:31-36.
- HOOKEY J. V., RICHARDSON J. F., COOKSON B. D. 1998. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.* 36:1083-1089.
- IKEDA T., TAMATE N., YAMAGUCHI K., MAKINO S. 2005. Mass Outbreak of food poisoning caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2793-2795.
- JACQUET C., CATIMEL B., BROSCHE R., BUCHRIESER C., DEHAUMONT P., GOULET V., LEPOUTRE A., VEIT P., ROCOURT J. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2242-2246.
- JEMMI T., SCHMID H., STEPHAN R. 2002. *Listeria monocytogenes*: Gesundheitsrisiko und Hygieneindikator. Amtstierärztlicher Dienst II/2002:98-101.
- JENSEN J., LARSEN H. E. 1973. Proceedings: Netherlands Society for Microbiology meeting at Utrecht on 2 May 1973. Sporulation of anaerobic sporeformers. *Nord. Vet. Med.* 25:322-329.
- JERMINI, M.F.G., DOMENICONI, F., BISSIG, F., JÄGGLI, M. 1990. Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton Tessin: Enterotoxigenic *S. aureus*- und *E. coli*-Stämme. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 81:633-654.
- JOHANSSON T., RANTALA L., PALMU L., HONKANEN-BUZALSKI T. 1999. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *Int. J. Food Microbiol.* 47:111-119.
- KARMALI M. A. 1989. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15-38.
- KATO E., KUME T. 1980. Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California mastitis test-positive milk in Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 28:75-85.
- KAUFFMANN F. 1947. The serology of the *E. coli* group. *J. Immunol.* 57:71-100.
- KEENE W. E., HEDBERG K., HERRIOTT D. E., HANCOCK D. D., MCKAY R. W., BARRETT T. J., FLEMING D. W. 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J. Infect. Dis.* 176:815-818.
- KLIE H., TIMM M., RICHTER H., GALLIEN P., PERLBERG K. W., STEINRUCK H. 1997. Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin

- producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 110:337-341.
- KLINGER J. D. 1988. Isolation of *Listeria*: a review of procedures and future prospects. *Infection*, 16: 98-105.
- KLOOS W. E., SCHLEIFER K. H. 1986. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holte), S. 1013-1035. Williams and Wilkins, Baltimore.
- KOENING S., MARTH E. H. 1982. Behavior of *Staphylococcus aureus* in Cheddar made with sodium chloride or a mixture of sodium chloride and potassium chloride. *J. Food Prot.* 45:996.
- LAHTI E., EKLUNG M., RUUTU P., SIITONEN A., RANTALA L., NUORTI P., HONKANEN-BUZALSKI T. 2002. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:189-195.
- LAW D. 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88:729-745.
- LIN J., SMITH M. P., CHAPIN K. C., BAIK H. S., BENNETT G. N., FOSTER J. W. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3094-3100.
- LONCAREVIC S., DANIELSSON-THAM M. L., THAM W. 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.* 26:245-250.
- LOVETT J. 1988. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71:658-660.
- LOVETT J., FRANCIS D. W., HUNT J. M. 1983. Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:459-462.- 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.* 50:188-192.
- MACDONALD P. D., WHITWAM R. E., BOGGS J. D., MACCORMACK J. N., ANDERSON K. L., REARDON J. W., SAAH J. R., GRAVES L. M., HUNTER S. B., SOBEL J. 2005. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin. Infect. Dis.* 40:677-682.
- MAHER M. M., JORDAN K. N., UPTON M. E., COFFEY A. 2001. Growth and survival of *E.coli* O157:H7 during manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 90:201-207.

- MARTIN M. L., SHIPMAN L. D., WELLS J. G., POTTER M. E., HEDBERG K., WACHSMUTH I. K., TAUXE R. V., DAVIS J. P., ARNOLDI J., TILLELI J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uremic syndrome. *Lancet* ii: 1043.
- MASSA S., CESARONI D., PODA G., TROVATELLI L. D. 1990. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. *J. Appl. Bacteriol.* 68:153-156.
- MCCLAINE D., LEE W. H. 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:660-664.
- MCKEE R., MADDEN R. H., GILMOUR A. 2003. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments. *J. Food Prot.* 66:1576-1580.
- MEHROTRA M., WANG G., JOHNSON W. M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1035.
- MEYRAND A., BOUTRAND-LOEI S., RAY-GUENIOT S., MAZUY C., GASPARD C. E., JAUBERT G., PERRIN G., LAPEYRE C., VERNIZY-ROZAND C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J. Appl. Microbiol.* 85:537-544.
- MONTAG M. 1994. Zur Häufigkeit Shiga-like Toxin bildender *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln in Norddeutschland, untersucht mit der Polymerasekettenreaktion (PCR). Inaug. Dissertation, Universität Hamburg.
- MORETTI A., PASQUALI P., MENCARONI G., BONCIO L., PIERGILI FIORETTI D. 1998. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeast and bacteria). *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 45:129-132
- MORGAN D., NEWMAN, C. P., HUTCHINSON D. N., WALKER A. M., ROWE B., MAJID F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111:181-187.
- MOURA S. M., DESTRO M. T., FRANCO B. D. 1993. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 19:229-237.
- MÜLLER, M., HAHN, G., HEESCHEN, W. 1996. Zur Entwicklung und Enterotoxinbildung von *S. aureus* während der experimentellen

- Herstellung von Rohmilch-Weichkäse unter verschiedenen Ausgangsbedingungen. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 48:195-208
- OMBUI, J.N., ARIMI, S.M., KAYIHURA, M. 1992. Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. *East Afr. Med. J.* 69:123-125
- ORSKOV, I., ORSKOV, F. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology, T. Bergan, ed., Acad. Press, London. 43-112.
- ORWIN P. M., LEUNG D. Y., DONAHUE H. L., NOVICK R. P., SCHLIEVERT P. M. 2001. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69:360-366.
- PADILHA M. R., FERNANDES Z. F., LEAL T. C., LEAL N. C., ALMEIDA A. M. 2001. Investigation of pathogenic bacteria in pasteurized type C milk sold in Recife City, Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34:167-171.
- PARK H. S., MARTH E. H., GOEPFERT J. M., OLSON N. F., 1970. The fate of *Salmonella typhimurium* in the manufacture and ripening of low acid Cheddar cheese. *J. Milk Food Technol.* 33:280.
- PAYNE, D.N., WOOD, J.M. 1974. The incidence of enterotoxin production in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Appl. Bact.* 37, 319-325
- PEEL, M., DONACHIE, W., SHAW, A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.*, 143:2171-2178.
- PIÉRARD D., STEVENS D., MORIAU L., LIORAND H., LAUWERS S. 1997. Isolation and virulence factors of verotoxin-producing *E.coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 3: 531-540.
- PRADEL N., LIVRELLI V., DE CHAMPS C., PALCOUX J. B., FEYNAUD A., SCHEUTZ F., SIROT J., JOLY B., FORESTIER C. 2000. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38:1023-1031
- QUINTO E. J., CEPEDA A. 1997. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:291-295
- RAMSARAN H., CHEN J., BRUNKE B., HILL A., GRIFFITHS M. W. 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 81:1810-1817.

- REID T. M. S. 2001. A case study of cheese associated *E. coli* O157 outbreaks in Scotland. Pages 201-212 in Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. G. Duffy, P. Garvey, and D. McDowell, ed. *Food and Nutrition Press Inc.* Trumbull, CT.
- REITSMA C. J., HENNING D. R. 1996. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and curding of Cheddar cheese. *J. Food Prot.* 59:460-464.
- REUBEN A., TREMINIO H., ARIAS M. L., CHAVAS C. 2003. Presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food from animal origin in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53:389-392.
- RILEY L. W., REMIS R. S., HELGERSON S. D., MCGEE H. B., WELLS J. G., DAVIS B. R., HEBERT R. J., OLCOTT E. S., JOHNSON L. M., HARGRETT N. T., BLAKE P. A., COHEN M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
- RODLER M., KORBLER W. 1989. Examination of *Listeria monocytogenes* in milk products. *Acta. Microbiol. Hung.* 36:259-261.
- RODRIGUE D. C., MAST E. E., GREENE K. D., DAVIS J. P., HUTCHINSON M. A., WELLS J. G., BARRETT T. J., GRIFFIN P. M. 1995. A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J. Infect. Dis.* 172:1122-5.
- ROHRBACH B. W., DRAUGHON F. A., DAVIDSON M. P., OLIVER S. P. 1992. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: Risk factors and risk of human exposure. *J. Food Prot.* 55:93-97.
- RUDOL M., SCHERER S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 22:91-98.
- RÜSSMANN H., KOTHE E., SCHMIDT H., FRANKE S., HARMSSEN D., CAPRIOLI A., KARCH H. 1995. Genotyping of Shiga-like toxin genes in non O-157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* 42:404-410.
- SALAMINA G., DALLE DONNE E., NICCOLINI A., PODA G., CESARONI D., BUCCI M., FINI R., MALDINI M., SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B., BIBB W., ROCOURT J., BINKIN N., SALMASO S. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.* 117:429-436.
- SANAA M., POUTREL B., MENARD J. L., SERIEYS F. 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* 76:2891-2898.

- SCHÄLLIBAUM M. 1996. Mastitis pathogens in Switzerland (1988-1993). IDF Mastitis Newsletter 20.
- SCHÄLLIBAUM M., BAUMGARTNER H., VIFIAN F., 1978. Zur Frage der Mastitisbekämpfung aufgrund bakteriologischer Untersuchungen von Mischmilchproben. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 120:547.
- SCHMIDT H., BEUTIN L., KARCH H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63:1055-1061.
- SCHMIDT H., PLASCHKE B., FRANKE S., RÜSSMANN H. SCHWARZKOPF A., HEESEMANN J., KARCH H. 1994. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae*-genes. *Med. Microbiol. Immunol.* 183:23-31.
- SEELIGER H. P. R. 1961. Listeriosis. Hafner Publ. Co., Inc., New York, NY.
- SEELIGER H. P. R., JONES D. 1986. *Listeria*. Bergey's manual of systematic bacteriology, P. H. Sneath, ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1235-1245.
- SENCZEK D., STEPHAN R., UNTERMANN F. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from meat processing plant over a 2-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 62:155-159.
- SLADE P. J., FISTROVICI E. C., COLLINS-THOMPSON D. L. 1989. Persistence at source of *Listeria* spp. in raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 9:197-203.
- STAJNER B. A. 1971. Excretion of *Listeria* in the milk of infected cows. *Acta Veterinaria*, Beograd 21:217-224.
- STEELE M. L., McNAB B. W., POPPE C., GRIFFITHS M. W., CHEN S., DEGRANDIS S., FRUHNER L. C., LARKIN C. A., LYNCH J. A., ODUMERU J. A. 1997. Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. *J. Food Prot.* 60:1341-1346.
- STEPHAN, R. 2000. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy slaughter pigs in Switzerland. *Vet. Rec.* 147:747-748.
- STEPHAN R., BÜHLER K. 2002. Prävalenz von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* in Bestandesmilchproben aus der Nordostschweiz. Arch. Lebensmittelhyg.
- STEPHAN R., DURA U., UNTERMANN F. 1999. Resistance situation and enterotoxin production capacity of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis milk samples. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 141:287-290.

- STEPHAN R., UNTERMANN F. 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J. Clin. Microbiol.* 37:1570-1572.
- STEPHAN R., ANNEMULLER C., HASSAN A. A., LAMMLER C. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78:373-382.
- STRAUB J. A., HERTEL C., HAMMES W. P. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 62:1150-1156.
- TAEGE, A. J. 1999. Listeriosis: recognizing it, treating it, preventing it. *Cleve. Clin. J. Med.*, 66:375-380.
- TAKESHIGE, K., WATANABE, K., IGARISHI, H., SHINGAKI, M., TERAYAMA, T. 1983. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45:355-362.
- TATINI S. R., JEZESKI J. J., OLSON J. C. CASMAN E. P. 1971. Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A. *J. Dairy Sci.* 51:645.
- TATINI S. R., WESALA W. D., JEZESKI J. J., MORRIS H. A. 1973. Production of staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss cheeses. *J. Dairy Sci.* 56:429.
- THOMAS A., CHART H., CHEASY T., SMITH H. R., FROST J. A., ROWE B. 1993. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in the United Kingdom: 1989-91. *Epidemiol. Infect.* 110:591-600.
- TONDO E. C., GUIMARES M. C., HENRIQUES J. A., AYUB M. A. 2000. Assessing and analysing contamination of dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotics resistance and PFGE. *Can. J. Microbiol.* 46:1108-1114.
- TRANter, H.S. 1990. Foodborne staphylococcal illness. *Lancet* 336:1044-1046.
- TROLLER, J.A. 1976. Staphylococcal growth and enterotoxin production-factors for control. *J. Milk Food Technol.* 39:499-503.
- TUCKEY S. L., STILES M. E., ORDAL J. Z., WITTER L. D. 1964. Relation of cheese-making operations to survival and growth of *Staphylococcus aureus* in different varieties of cheese. *J. Dairy Sci.* 47:604.

- TUTTLE J., GOMEZ T., DOYLE M. P., WELLS J. G., ZHAO T., TAUXE R. V., GRIFFIN P. M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol. Infect.* 122:185-192.
- UPTON P., COIA J. E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* 344:1015.
- VAN NETTEN, P., PERALES, I., VAN DE MOOSDIJK, A., CURTIS, G. D. W., D.A.A., M. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, 8:299-316.
- VERNOZY-ROZAND C., MEYRAND A., MAZUY C., DELIGNETTE-MULLER M. L., JAUBERT G., PERRIN G., LAPEYRE C., RICHARD Y. 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J. Dairy Res.* 65:273-281.
- VITAS A. I., GARCIA-JALON V. A. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navara (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 90:349-356.
- WALLACE, J. S., CHEASTY, T., JONES, K. 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* 82:399-404.
- WELLS J. G. SHIPMAN L. D., GREENE K. D., SOWERS E. G., GREEN J. H., CAMERON D. N., DOWES F. P., MARTIN M. L., GRIFFIN S. M., OSTROFF M. E., POTTER R. V., TAUXE R. V., WACHSMUTH K. I. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29:985-989.
- WIENEKE A. A., ROBERTS D., GILBERT R. J. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* 110:519-531.
- WIESMANN E., KAYSER F. H., BIENZ K. A., ECKERT J., LINDENMANN J. 1986. *Staphylococcus*. In *Medizinische Mikrobiologie* (ed. E. Wiesmann), S. 130-134. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WILLSHAW G. A., THIRWELL J., JONES A. P., PARRY S., SALMON R. L., HICKEY M. 1994. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:304-307.
- WILSON J. B., CLARKE R. C., RENWICK S. A., RAHN K., JOHNSON R. P., KARMALI M. A., LIOR H., ALVES D., GYLES C. L., SANDHU K. S., MCEWAN S. A.,

- SPIKA J. S. 1996. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.* 174:1021-1027.
- WILSON J. B., MCEWEN S. A., CLARKE R. C., LESLIE K. E., WILSON R. A., WALTNER-TOEWS, D., GYLES C. L. 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol. Infect.*, 108:423-439.
- WITTE W. 2000. Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus* unter besonderer Berücksichtigung der MRSA. Robert Koch Institut.
- YAMAMATO T., NAKAZAMA M. 1997. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable Enterotoxin 1 Gene in enterotoxigenic *E.coli* strain isolated from piglets and calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35:223-227.
- ZEHREN V. L., ZEHREN V. F. 1968. Relation of acid development during cheese making to development of staphylococcal enterotoxin A. *J. Dairy Sci.* 51:645.
- ZHAO T., DOYLE M. P., BESSER R. E. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2526-2530.
- ZOTTOLA E. A., SMITH L. B. 1991. Pathogens in cheese. *Food Microbiol.* 8:171.

9 Dank

An dieser Stelle möchte ich allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. R. Stephan, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Beratung und die Überarbeitung des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. F. Ehrensperger, Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. C. Zweifel für die Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Frau Dr. S. Corti für die Mithilfe bei den praktischen Arbeiten.

Frau S. Schumacher für die Durchführung der PCR und Genotypisierung.

Herrn J. Giletycz für die Herstellung der Medien und Nährlösungen.

Fam. Müller für die herzliche Aufnahme im Goms.

Gerhard und Marianne Zürcher für die Unterstützung bei der Probensammlung in der Käserei Gluringen.

Allen Beteiligten der Biokäsereigenossenschaft für die stets freundliche Aufnahme und Mitarbeit.

CURRICULUM VITAE

Name Martina Andrea, Rusch

Geburtsdatum 17. Oktober 1977

Geburtsort Lachen SZ

Nationalität Schweiz

Heimatort Appenzell

1984 - 1990 Primarschule in Altendorf

1990 - 1997 Gymnasium am Kollegium Nuolen

1997 Matura Typus B

1998 - 2003 Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich, Schweiz

2000 Austauschsemester an der Veterinärmedizinischen
Universität Wien, Österreich

2003 Staatsexamen an der Universität Zürich, Schweiz

2004 - 2005 Assistenztierärztin, Kleintierpraxis Dr. Unternährer,
Altendorf, Schweiz

2004 - 2005 Doktorandin, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Zürich, Schweiz

13. Juli 2005